



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS
COMO INHIBIDORES DE BIOFILM EN AISLADOS DE *Escherichia coli*
PRODUCTORES DE TOXINA SHIGA (STEC)**

GLADYS MELISA FLORENTIN CANDIA

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Marzo, 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS
COMO INHIBIDORES DE BIOFILM EN AISLADOS DE *Escherichia coli*
PRODUCTORES DE TOXINA SHIGA (STEC)**

GLADYS MELISA FLORENTIN CANDIA

Tutor: PROF. DRA. ROSA GUILLÉN, PhD

Co-tutor: PROF. DR. NELSON ALVARENGA, PhD

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Marzo, 2021

Florentín Candia, Gladys Melisa

Evaluación de la actividad de extractos de plantas como inhibidores de biofilm en aislados de *Escherichia coli* productores de toxina shiga (STEC) / Gladys Melisa Florentin Candia; Tutora: Rosa María Guillén Fretes, Co-tutor: Nelson Alvarenga. -- San Lorenzo : UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencia de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas; 2021.

xvii, 86 p; il

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas) – UNA, IICS, FCQ; 2021

1. *Escherichia coli* Shiga-Toxigénica 2. Biopelículas 3. Bovinos 4. Extractos vegetales I. Título

CDD (ed.18^a) 576.163
F662e



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN

CIENCIAS DE LA SALUD

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LA **PROF. DRA. ROSA GUILLEN, PhD.** DOCENTE INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Evaluación de la actividad de extractos de plantas como inhibidores de biofilm en aislados de *Escherichia coli* productores de toxina Shiga (STEC)”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **GLADYS MELISA FLORENTIN CANDIA** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 31 días del mes de mayo de 2021.

Tutora: Prof. Dra. Rosa Guillén, PhD.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

EL **PROF. DR. NELSON ALVARENGA, PhD.** DOCENTE/DOCENTE INVESTIGADOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Evaluación de la actividad de extractos de plantas como inhibidores de biofilm en aislados de *Escherichia coli* productores de toxina Shiga (STEC)”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **GLADYS MELISA FLORENTIN CANDIA** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 31 días del mes de mayo de 2021.

Co-Tutor: Prof. Dr. Nelson Alvarenga, PhD.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

LA **B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc**,
COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA
UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “Evaluación de la actividad de extractos de plantas como inhibidores de biofilm en aislados de *Escherichia coli* productores de toxina Shiga (STEC)”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **GLADYS MELISA FLORENTIN CANDIA** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección de la docente investigadora **PROF.DRA. ROSA GUILLÉN, PhD**, y la co-dirección del **PROF.DR. NELSON ALVARENGA, PhD**, considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 18 días del mes de junio de 2021.

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.

Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Evaluación de la actividad de extractos de plantas como inhibidores de biofilm en aislados de *Escherichia coli* productores de toxina Shiga (STEC).

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Gladys Melisa Florentin Candia

Aprobado el 25 de junio de 2021

Tribunal examinador:

Prof. Dra. María Eugenia Flores, Facultad de Ciencias Químicas-UNA, Asunción,
Paraguay

Prof. Dra. María Cristina Romero, Facultad de Ciencias Químicas-UNA, Asunción,
Paraguay

Prof. Dr. José Plans Perrota, Facultad de Ciencias Químicas-UNA, Asunción,
Paraguay

Prof. Dra. Juana Ortellado de Canese, Facultad de Ciencias Químicas-UNA,
Asunción, Paraguay

Prof. Dra. Rosa Guillén, PhD.
Tutora

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.
Directora de Postgrado FCQ

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por iluminarme y guiarme paso a paso en la vida, por las bendiciones recibidas y por regalarme el don de esta vocación.

A mis tutores Dra. Rosa Guillén y Dr. Nelson Alvarenga. Gracias por la paciencia, dedicación, por el inmenso aporte intelectual, motivación y cariño. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

Agradezco al CONACYT por la oportunidad de realizar la maestría en Ciencias Biomédicas y al Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud por brindarme un espacio para realizar mi tesis de Maestría.

Principalmente agradezco a mis padres Gladys y Miguel, por ser mi razón de existir, el motor principal de esta meta alcanzada, fuente inspiradora y pilar de cada paso dado tanto profesionalmente como en la vida misma. Por demostrarme que en la superación personal no me encuentro sola.

A mi hermano Miguel por acompañarme, apoyarme y aconsejarme. Por ser incondicional durante estos años.

A Freddy por ser parte de este logro, por estar presente en mis batallas más duras y ayudarme a alcanzar mi meta. Gracias por el apoyo incondicional, la paciencia y el amor.

Agradezco a toda mi familia, mi abuela Carmen, tíos/as, primos/as que siempre se preocuparon por mí durante estos años, por el apoyo y palabras de aliento a lo largo de mi carrera.

A todos mis amigos por hacer que este camino sea llevadero, en especial a Anyi, Pati y Christa. Gracias por la amistad tan sincera que me brindan, el cariño, las risas y los incontables momentos increíbles a sus lados.

A todos los que me brindaron su aliento y en cuyas oraciones estuve.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS COMO INHIBIDORES DE BIOFILM EN AISLADOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORES DE TOXINA SHIGA (STEC).

Gladys Melisa Florentin Candia*, Dra. Rosa María Guillén Fretes**, Dr. Nelson Alvarenga***

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

*** Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

La formación de biofilm en alimentos y otras superficies es una característica que aumenta el potencial de STEC como fuente de contaminación, así como incrementar su resistencia a antibióticos. Los genes *fimH*, *flu* y *csgA* se han asociado a la capacidad de formación de biofilm en STEC. Lograr alternativas como aquellos provenientes de plantas para combatir esta problemática podría tener un impacto significativo. Este estudio experimental se realizó con el objetivo de evaluar la actividad de 20 extractos vegetales frente al biofilm de 4 aislados STEC provenientes de ganado bovino paraguayo. La detección de los genes *csgA*, *fimH* y *flu* se realizó por PCR. La actividad inhibidora y removedora de biofilm se realizó mediante ensayo en placa de poliestireno, además, se determinó la huella cromatográfica de extractos que presentaron excelente actividad inhibidora y removedora de biofilm frente a los 4 aislados. Los aislados de serogrupos O54, O22 y O74 resultaron ser portadores de los genes *fimH*, *flu* y *csgA* y el aislado de serogrupo O115 ser portador de los genes *fimH* y *csgA*. Los extractos metanólicos de *Sidastrum paniculatum*, *Ocotea diospyrifolia* y *Aloysia virgata* resultaron ser excelentes inhibidores como removedores de biofilm de los 4 aislados STEC analizados. El análisis de la huella cromatográfica de *O. diospyrifolia* arrojó como principales metabolitos a la dicentrina, glaucina y norisoboldina; para el *S. paniculatum* se indica la presencia de los metabolitos de moupinamida, ácido coutárico y ácido caftárico, y para el extracto de *Aloysia virgata* se detectó la presencia del ácido ferúlico y la hoffmaniacetona. Los hallazgos son prometedores para posteriores estudios orientados a purificar estos compuestos y determinar si son responsables de excelente actividad antibiofilm y que podrían ser aplicados en un futuro como alternativas válidas a los agentes biocidas convencionales.

Palabras clave: *Escherichia coli* Shiga-Toxigénica, Biopelículas, Bovinos, Extractos vegetales

EVALUATION OF THE ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS AS BIOFILM INHIBITORS IN ISOLATES OF *Escherichia coli* PRODUCING SHIGA TOXIN (STEC)

Gladys Melisa Florentin Candia*, Dra. Rosa María Guillén Fretes**, Dr. Nelson Alvarenga***

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

*** Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

ABSTRACT

Biofilm formation in food and other surfaces is a hallmark that increases the potential of STEC as a source of contamination, as well as increasing its antibiotic resistance. The *fimH*, *flu* and *csgA* genes have been associated with biofilm forming capacity in STEC. Alternatives to combat this problem, such as those from plants, could have a significant impact. This experimental study was carried out with the aim of evaluating the activity of 20 plant extracts against the biofilm of 4 STEC isolates from Paraguayan cattle. Detection of the *csgA*, *fimH* and *flu* genes was performed by PCR. The inhibitory and remover activity of biofilm was performed by testing on polystyrene plaque. In addition, the chromatographic fingerprint of the extracts that had excellent inhibitory and biofilm remover activity against the 4 isolates was determined. The serogroup isolates O54, O22 and O74 turned out to be carriers of the *fimH*, *flu* and *csgA* genes, whereas the serogroup isolate O115 only carried the *fimH* and *csgA* genes. The methanolic extracts of *Sidastrum paniculatum*, *Ocotea diospyrifolia* and *Aloysia virgata* turned out to be excellent inhibitors as biofilm removers of the 4 STEC isolates analyzed. Analysis of the chromatographic fingerprint of *O. diospyrifolia* yielded dicentrin, glaucine and norisoboldine as major metabolites and for *S. paniculatum* the presence of the moupinamide, coutaric acid and caffeoyle tartaric acid metabolites were detected, and for the extract of *Aloysia virgata* was detected the presence of ferulic acid and hoffmaniacetone. The findings are promising for further studies aimed at purifying these compounds and determining whether they are responsible for excellent antibiofilm activity and that could be applied in the future as valid alternatives to conventional biocidal agents.

Keyword: *Escherichia coli* Shiga-Toxigenic, Biofilms, Cattle, Plant Extracts

INDICE

1.	MARCO TEÓRICO	1
1.1	Enfermedades transmitidas por alimentos	1
1.2	<i>Escherichia coli</i> . Generalidades.....	2
1.3	<i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC)	3
1.4	Biofilm como factor de virulencia	4
1.4.1	Etapas en el proceso de formación del biofilm	5
1.4.2	Regulación del proceso de formación del biofilm	6
1.4.3	Determinantes superficiales de la formación de biofilm en STEC.....	7
1.4.4	Biofilm en las industrias alimentarias	10
1.5	Bovinos como reservorios de <i>E. coli</i> patógenas	11
1.6	Situación en Paraguay.....	11
1.7	Plantas como agentes antibiofilm.	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo General.....	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1	Diseño del estudio.....	16
3.2	Selección de aislados	16
3.3	Selección de extractos vegetales.....	18
3.4	Flujograma general de trabajo	20
3.5	Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y conservación.....	21
3.6	Caracterización genotípica.....	22

3.7	Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los 20 extractos vegetales.....	25
3.8	Ensayo de inhibición y remoción de biofilm	27
3.9	Determinación de la huella dactilar cromatográfica de los extractos vegetales con actividad inhibitoria y removedora de biofilm.	32
3.10	Asuntos estadísticos	33
3.11	Consideraciones éticas	33
4.	RESULTADOS	35
4.1	Portación de genes asociados a la formación de biofilm	35
4.2	Portación de factores de virulencia con respecto a los perfiles genéticos de biofilm en aislados STEC.....	36
4.3	Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	36
4.4	Determinación del efecto inhibitorio de los extractos vegetales sobre la formación de biofilm	38
4.5	Determinación del efecto dosis-respuesta de los extractos vegetales sobre la formación de biofilm	40
4.6	Determinación del efecto de remoción de biofilm por parte de los extractos vegetales	41
4.7	Determinación del efecto dosis-respuesta en la remoción de biofilm por parte de los extractos vegetales	43
4.8	Determinación de la huella dactilar cromatográfica de los extractos vegetales con actividad inhibitoria y removedora de biofilm.	46
5.	DISCUSIÓN	51
5.1	Detección de genes asociados a la formación de biofilm	51
5.2	Determinación de concentración inhibitoria mínima.....	53
5.3	Determinación del efecto inhibitorio de la formación de biofilm y la actividad removedora de los extractos vegetales sobre el biofilm	56

5.4	Perfil cromatográfico de los extractos de <i>O. diospyrifolia</i> , <i>S. paniculatum</i> y <i>A. virgata</i>	63
6.	CONCLUSIÓN	66
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8.	ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de las etapas en el proceso de formación de biofilm	6
Figura 2. Flujograma de selección de aislados STEC	17
Figura 3. Flujograma general de trabajo con 4 aislados STEC y 20 extractos vegetales	21
Figura 4. Preparación de inóculo bacteriano para el ensayo de CIM	25
Figura 5. Ensayo de determinación de CIM para extractos vegetales metanólicos	27
Figura 6. Flujograma de los ensayos de inhibición y remoción de biofilm de STEC por actividad de extractos vegetales	29
Figura 7. Ensayo de inhibición de la formación de biofilm utilizando extractos vegetales	30
Figura 8. Detección de los genes <i>fimH</i> , <i>flu</i> y <i>csgA</i>	34
Figura 9. Cromatogramas correspondientes a patrones de fragmentación de los picos base analizados para el extracto de <i>Ocotea diospyrifolia</i> . Perfiles obtenidos por LC-DAD-MS	47
Figura 10. Cromatogramas correspondientes a patrones de fragmentación de los picos base analizados para el extracto de <i>Sidastrum paniculatum</i> . Perfiles obtenidos por LC-DAD-MS	49
Figura 11. Cromatogramas correspondientes a los picos analizados para el extracto de <i>Aloysia virgata</i> . Perfiles obtenidos por LC-DAD-MS	50

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Características de los aislados STEC estudiados	18
Tabla 2. Nombre científico o común, partes de las plantas utilizadas y familias a la que pertenece	19
Tabla 3. Blancos utilizados en los ensayos de inhibición y remoción de biofilm	31
Tabla 4. Características de los aislados STEC estudiados	35
Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria en mg/mL de los extractos vegetales metanólicos contra serogrupos de STEC	36
Tabla 6. Actividad inhibitoria de la formación de biofilm en aislados STEC	37
Tabla 7. Efecto dosis-respuesta de inhibición de la formación de biofilm	40
Tabla 8. Actividad removedora de biofilm en aislados STEC	41
Tabla 9. Efecto dosis-respuesta en la remoción de biofilm de STEC	44

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

AIEC: *E.coli* adherente-invasiva

BHI: Infusión Cerebro Corazón, del inglés *Brain Heart Infusion*

CH: Colitis Hemorrágica

CIM: concentración mínima inhibitoria

CV: Cristal violeta

DAEC: *E.coli* de adherencia difusa

DEC: *E.coli* diarrogénicas

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTP: Dinucleótidos trifosfato

E.coli: *Escherichia coli*

eae: Gen codificante de la Intimina

ETA: enfermedad transmitida por alimentos

EAEC: *E.coli* enteroagregativas, del inglés *Enteroggregative E.coli*

hly: Hemolisina

EIEC: *E.coli* enteroinvasiva, del inglés *Enteroinvasive E.coli*

EPEC: *E.coli* enteropatógena, del inglés *Enteropathogenic E.coli*

ETEC: *E.coli* enterotoxigénica, del inglés *Enterotoxigenic E.coli*

IICS: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

LB: Luria Bertani

LC-DAD-MS: Cromatografía líquida acoplada a arreglo de diodos y a espectrometría de masas en tándem.

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

mL: mililitro

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pH: Potencial de hidrógeno

SENACSA: Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal

STEC: *E.coli* productora de toxina Shiga, del inglés *Shiga like toxin producing E.coli*

SUH: Síndrome urémico hemolítico

TSA: agar triptona de soja

TSB: caldo de triptona de soja

uL: Microlitro

UFC: Unidad formadora de colonia

UV: Ultravioleta

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen una de las principales problemáticas para la Salud Pública, definidas por la Organización Panamericana de la Salud como el síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupal (1,2).

Se reconocen más de 250 ETA en la actualidad cuya causa puede ser infecciosa o tóxica, pudiendo producir discapacidad persistente e incluso la muerte. En el caso de ser infecciosa los agentes etiológicos pueden ser parásitos, bacterias o virus; y en el caso de ser tóxica se deben a toxinas o compuestos químicos que se incorporan a los alimentos. Los patógenos de transmisión alimentaria pueden causar diarrea grave o infecciones debilitantes y la contaminación por sustancias químicas puede provocar intoxicaciones agudas o enfermedades crónicas como el cáncer. Se han reportado brotes de ETA ocasionadas por bacterias patógenas emergentes como: *Escherichia coli* O157 y no-O157 en carnes y vegetales, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* en carnes y quesos, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* en carne de cerdo y aves, *Shigella dysenteriae* en agua y *Enterobacter sakasaki* en productos lácteos (1,3,4).

Desde el año 2000, los Estados miembros de la OMS han publicado una resolución en la cual reconocen el papel fundamental de la inocuidad alimentaria para la Salud Pública con el fin de garantizar la máxima seguridad de los alimentos y asumir políticas y actividades que deben abarcar toda la cadena de elaboración, desde la producción hasta el consumo debido a la constante aparición de nuevas amenazas para la inocuidad de los alimentos. Tanto los cambios en la producción en los establecimientos agroganaderos, la globalización del comercio de alimentos y el consumo de alimentos, los cambios medioambientales, la aparición de nuevas bacterias y toxinas, y la resistencia a los antimicrobianos y la capacidad de estos de formar biofilm, potencian el riesgo de contaminación de los alimentos. El aumento de los viajes y del comercio son factores cruciales que incrementan la posibilidad de propagación de la contaminación (5).

En el año 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado que los alimentos insalubres se encuentran relacionados con la muerte de 2 millones de personas al año, en su mayoría niños, tanto en los países en vía de desarrollo como en los de primer mundo. En el informe de 2018 del Banco Mundial sobre la carga económica de las enfermedades de transmisión alimentaria se indicaba que el costo de la pérdida total de productividad asociada con ese tipo de enfermedades en los países de ingresos bajos y medianos se estimaba en US\$ 95 200 millones anuales, y que el costo anual del tratamiento de estas enfermedades se estima en US\$ 15 000 millones (6).

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) reporta que en EEUU se enferman 76 millones de personas por el consumo de alimentos contaminados, 325.000 son hospitalizados y 5.000 casos son fatales. Además de la morbilidad y mortalidad aguda, algunas de estas infecciones pueden causar significativas secuelas a largo plazo, principalmente se hace referencia a la patología Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) que presenta el cuadro de insuficiencia renal aguda o crónica como consecuencia de la infección con *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) (7).

La carga que las enfermedades de transmisión alimentaria imponen a la salud pública, el bienestar social y las economías se ha subestimado a menudo debido a la infra notificación y la dificultad para establecer una relación de causalidad entre las contaminaciones de alimentos y las enfermedades o muertes por ellas provocadas (1,8–10).

1.2 *Escherichia coli*. Generalidades

E. coli es una bacteria Gram negativa de la familia de las *Enterobacteriaceae* que forma parte de la microbiota intestinal de diferentes animales incluido el hombre. Ésta y otras bacterias que colonizan el intestino son necesarias para el funcionamiento correcto del aparato digestivo; sin embargo algunas cepas de *E. coli* son patógenas y pueden causar daño intestinal o extraintestinal a través de la síntesis de diversas toxinas y otros factores de virulencia adquiridos por intercambio genético (11,12). Son importantes agentes causantes de diarrea en humanos, su presencia en el agua es utilizada como un indicador de contaminación con materia fecal. Los bovinos son los principales reservorios de las *E.coli* patógenas que infectan a los humanos (13–15).

Las cepas patógenas con capacidad de causar enfermedades gastrointestinales son denominadas *E.coli* diarrogénicas (DEC) y están asociadas a factores de riesgo como el consumo de agua o alimentos contaminados, incluyendo principalmente carnes mal cocidas, productos lácteos no pasteurizados y vegetales que tuvieron contacto con materia fecal de los bovinos o ambientes contaminados (13–15). La clasificación de las DEC se da según el tipo de mecanismo patológico que las caracteriza e incluyen a las *E. coli* enteropatógenas (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enteroagregativas (EAEC), de adhesión difusa (DAEC) y productoras de toxina Shiga (STEC) (16).

1.3 *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC)

Las STEC, también conocidas como *E. coli* verotoxigénicas (VTEC) o enterohemorrágicas (EHEC) se caracterizan por la producción de dos potentes citotoxinas llamadas toxinas Shiga 1 y 2, codificadas respectivamente por los genes *stx1* y *stx2*. Constituyen un grupo importante dentro del conjunto de patógenos emergentes transmitidos por alimentos. En los seres humanos estas bacterias se asocian con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que varía desde diarrea leve y autolimitada hasta procesos más graves, muchas veces con secuelas importantes, como colitis hemorrágica (CH) o síndrome urémico hemolítico (SUH) (17).

El síndrome urémico-hemolítico (SUH) es un síndrome clínico que se caracteriza por la tríada diagnóstica de: anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (IRA). Es un síndrome que afecta principalmente a los niños y que se presenta fundamentalmente como casos esporádicos en los países del Cono Sur, especialmente Argentina ocupando el primer lugar en el mundo en incidencia del síndrome que es alrededor de 200 a 400 casos por año, o sea 7 a 12.5 pacientes por cada 100.000 niños, mientras en Chile y Uruguay la incidencia es de 4-5 casos por cada 100.000 niños. En Paraguay se describe un caso por primera vez en el año 2009 del aislamiento de *E. coli* 0157 H7 productor de Stx2 como agente etiológico de la gastroenteritis que causó el SUH (18,19). Se calcula que un 10% de los pacientes infectados por estas bacterias pueden desarrollar SUH, cuya mortalidad puede llegar al 5%. Otras complicaciones pueden ser del tipo neurológico (convulsiones, accidentes cerebrovasculares y coma) en el 25% de los casos, y secuelas renales crónicas en aproximadamente un 50% de los supervivientes. Típicamente, STEC afecta a los niños menores de 5 años, ancianos y pacientes inmunocomprometidos.

Aunque la mayoría de los pacientes con SUH se recuperan, algunos mueren y algunos pueden desarrollar insuficiencia renal aguda o crónica (20–26).

Las STEC pueden poseer otros factores de virulencia accesorios que aumentan su patogenicidad como la intimina codificada por el gen *eae* que causa lesiones de adherencia y borrado de las microvellosidades intestinales, las cepas portadoras de este gen se encuentran estrechamente asociadas a cuadros de diarrea severa, CH y SUH. Los otros factores accesorios son una enterohemolisina codificada por el gen *hlyA* y la proteína de adhesión autoaglutinante codificada por el gen *saa*, estos dos últimos genes están contenidos en plásmidos. La mayoría de los brotes de CH y de SUH se han atribuido a la cepa STEC del serotipo O157:H7, sin embargo las cepas STEC de otros serotipos (no-O157) también han generado recientemente brotes a nivel mundial (20–25,27).

El origen principal de los brotes por STEC son los productos de carne picada cruda o poco cocinada, la leche cruda y las hortalizas contaminadas por materia fecal. Sin embargo, las toxinas Shiga son termolábiles y se destruyen cociendo los alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70 °C o más. *E. coli* O157: H7 es el serotipo de *E. coli* productora de toxina Shiga más importante por su impacto en la salud pública, pero hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos (28).

1.4 Biofilm como factor de virulencia

Algunos estudios previos han demostrado que ciertas cepas STEC tienen la capacidad de unir, colonizar y formar biofilm en alimentos y otras superficies (29). Los biofilm son comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie viva o inerte (30,31). Las bacterias que forman el biofilm se hallan en forma sésil, exhibiendo un fenotipo diferente al de esas mismas células en forma unicelular o libre (forma planctónica) con respecto a la tasa de crecimiento y a la transcripción de genes (32).

La formación de biofilm es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en biofilm ofrece ventajas importantes: protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de

deshidratación y posibilita la transferencia de material genético (ADN). Todas estas circunstancias pueden incrementar sus capacidades de supervivencia. Como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm (31,32).

Podemos encontrar biofilm en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Solo se requiere la presencia de un entorno hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que pueden desarrollarse sobre todo tipo de superficies (hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas)(33).

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (34). En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (35).

Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio (31,36,37).

1.4.1 Etapas en el proceso de formación del biofilm

Se ha propuesto un modelo común para la formación de biofilm bacteriano diferenciado y maduro, que generalmente se desarrolla en cinco etapas. Estos episodios distintos en la formación del biofilm se visualizan en la **Figura 1** y comprenden primeramente una unión reversible inicial de bacterias planctónicas que se acercan a la superficie sólida por la corriente de fluido o a través de la motilidad y que han superado las fuerzas de repulsión entre la celda y la superficie, luego la transición de unión reversible a irreversible mediante la producción de polímeros extracelulares por la bacteria y / o adhesinas

específicas localizadas en pili y fimbrias, que interactúan con la superficie, seguidamente del desarrollo temprano de la arquitectura de biofilm y el desarrollo de microcolonias en un biofilm maduro. También durante esta etapa, se siguen produciendo sustancias poliméricas extracelulares que sirven como matriz adhesiva y atrapan nutrientes del medio ambiente. Se forman arquitecturas complejas con estructuras tipo pedestal, canales de agua y poros, en los que las bacterias desarrollan patrones específicos de crecimiento y una fisiología y metabolismo diferentes de las células planctónicas. Como último paso se observa la dispersión de las células del biofilm en el medio ambiente circundante y regreso al estado planctónico (32,36–38).

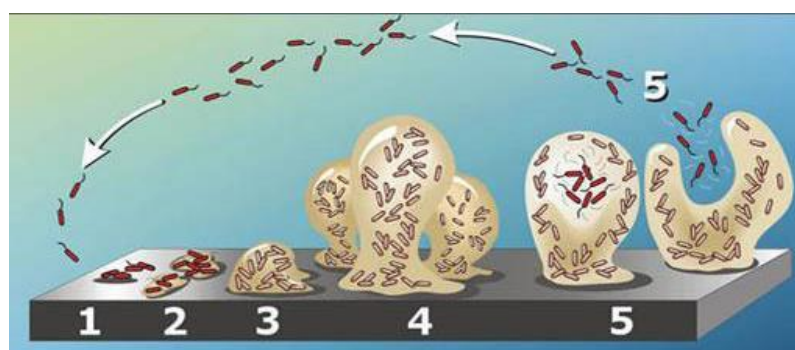


Figura 1: Esquema mostrando las etapas en el proceso de formación del biofilm. Extraído de Cogan-Keener, 2004 (39).

1.4.2 Regulación del proceso de formación del biofilm

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores (40). Un trabajo pionero con *Pseudomonas aeruginosa* demostró que el proceso de formación del biofilm está regulado por un proceso de *quorum sensing* o autoinducción. El sistema de *quorum sensing* es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente. En bacterias Gram negativas el principal autoinductor es acilhomoserina lactona (AHL) (31). Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del

autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos (41,42).

Existen otros reguladores globales del *quorum sensing*, como el CsrA y el AI-2 (autoinductor-2) que se demostraron que son determinantes importantes para el desarrollo de biofilm en *E.coli*, como también la existencia de una regulación postranscripcional del proceso de formación del biofilm (43).

Finalmente, la formación de biofilm se produce en respuesta a las condiciones ambientales y por tanto existen sistemas de transferencia de componentes que transmiten la señal ambiental al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental (44).

1.4.3 Determinantes superficiales de la formación de biofilm en STEC

Flagelos y motilidad

Las cepas de *E. coli* son generalmente móviles en virtud de múltiples flagelos peritricos. El papel de los filamentos flagelares, la motilidad y la quimiotaxis en la formación de biofilm se ha investigado mediante la inducción de mutaciones bien definidas (45). La influencia de estas mutaciones permitió la conclusión que la quimiotaxis era prescindible y la motilidad era crítica para el inicio de la formación del biofilm de *E. coli*. Las células no quimiotácticas formaron biofilm pero de características distintas a las células *wild type* o de control, mientras que las células que carecían de flagelos o que poseían flagelos paralizados se vieron seriamente obstaculizadas en las etapas iniciales de la formación del biofilm (45). Sugiriéndose por ende que la motilidad, pero no la quimiotaxis, promueve el contacto inicial célula-superficie, posiblemente superando las fuerzas de repulsión entre ambas, y también la contribución a la propagación de bacterias en crecimiento a lo largo de una superficie abiótica como la dispersión del biofilm (46).

Fimbria

Las fimbrias se han asociado con la adhesión tisular de importantes cepas patógenas de *E. coli* como las STEC (47). Las fimbrias de tipo 1 codificada por el gen *fimH* son las adhesinas más comunes que se encuentran en los aislamientos comensales y patógenos de *E.*

coli, así como en otras *Enterobacteriaceae*. Son orgánulos de superficie adhesiva de aproximadamente 7 nm de ancho y 1 μ m de longitud. El análisis de la formación de biofilm en cepas de *E.coli* con *fimH* mutadas indicó que son drásticamente defectuosos en la unión inicial a superficies abióticas (45). Estas observaciones ilustran que las fimbrias de Tipo 1 son críticas para la unión inicial estable de célula a superficie para varias cepas de *E. coli*. Además, las interacciones físicas entre las fimbrias Tipo 1 y una superficie sólida conducen a cambios estructurales en las membranas externas de las células adheridas, reflejadas por una reducción en el nivel de proteínas de la membrana externa (48).

Proteínas autotransportadoras

Las proteínas autotransportadoras son proteínas secretoras que contienen todos los requisitos para la secreción a través de la membrana citoplasmática y externa a la superficie de la célula bacteriana. Pueden funcionar como adhesinas, toxinas, proteasas, invasinas, factores de resistencia séricos o mediadores de la motilidad (49). Los fenotipos adhesivos se han atribuido a una subfamilia de autotransportadores de *E. coli*, incluidos Ag43, AIDA y TibA (50).

El antígeno 43 (Ag43) es una proteína de superficie prominente de *E. coli* (aproximadamente 50.000 copias por célula) y es el producto del gen *agn43* también llamado *flu*. Esta proteína autotransportadora es una adhesina autorreconocible, que contiene tanto el receptor como el sitio de reconocimiento del receptor. Sobresale aproximadamente 10 nm de la membrana externa (50). El antígeno 43 establece la autoagregación de las células mediante interacciones Ag43-Ag43 por un mecanismo de enlace intercelular (51) y promueve la formación de biofilm bacteriano por su capacidad para inducir la formación de microcolonias (52,53). Cuando se producen polisacáridos capsulares, que pueden extenderse de 0.2 a 1.0 μ m desde la superficie bacteriana, la interacción Ag43-Ag43 está estéricamente bloqueada y la formación de biofilm en estas cepas encapsuladas es independiente de Ag43 (54). Además, la presencia de fimbrias Tipo 1 anula la autoagregación mediada por Ag43, aparentemente porque estos orgánulos de aproximadamente 1 μ m de longitud bloquean el contacto celular cercano requerido para la interacción Ag43-Ag43 (51). Ambos operones se expresan coordinadamente para que las células produzcan normalmente solo un tipo de estructura de adherencia a la vez, lo que resulta en fenotipos mutuamente excluyentes (55).

Curli

Son apéndices filamentosos proteináceos heteropoliméricos que se componen de una subunidad mayor (CsgA) y menor (CsgB) e influyen en las propiedades de adherencia de varias cepas de *E. coli* formadoras de biofilm (56), incluida la STEC (57). Los genes para la producción de curli están organizados en los operones *csgBAC* y *csgDEFG*, pero solo la función de algunos de estos genes ha sido completamente identificada. Curli es producido por el gen *csgA*, mientras que la proteína CsgB se encuentra expuesto en la superficie bacteriana actuando como catalizador para la formación de curli insoluble (58). La implicancia de curli en la formación de biofilm se observó mediante la sobreexpresión del gen *csgA*, que daba como resultado un fenotipo formador de biofilm, mientras que una mutación *knockout* causaba la pérdida de adherencia. Además, esta sobreexpresión dio como resultado el desarrollo de un biofilm maduro y diferenciado en comparación con un biofilm indiferenciado formado por la cepa de tipo *wild type* (59).

Producción de exopolisacáridos

La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria, el ácido colánico o antígeno M es un polisacárido extracelular producido por la mayoría de las cepas de *E. coli* así como por otras especies de *Enterobacteriaceae*, es importante para establecer la compleja estructura tridimensional y la profundidad de los biofilm de *E. coli*. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm. Recientemente, el polisacárido β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PGA) no ramificado, un polímero involucrado en la adhesión por estafilococos, también se demostró que estaba involucrado en la unión a superficies abióticas, adhesión intercelular y formación de biopelículas en *E. coli* (60).

La presencia de STEC en una diversidad de productos alimenticios y superficies inertes sugiere la expresión de diferentes tipos de estructuras adhesivas, lo que explica la capacidad para unirse a varias superficies (29,61). De hecho, algunas adhesinas como la proteína curli, tipo fimbria y el antígeno 43 han sido implicadas en la formación de microcolonias y biofilm. En estudios recientes han reportado la presencia de éstos genes en

aislados STEC provenientes de ganado bovino encontrándose altas frecuencias de portación, 100% para los genes *csgA* y *fimH* y 94% para el gen *flu* (29,62–64).

1.4.4 Biofilm en las industrias alimentarias

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biofilm en tuberías, equipos y materiales ya que pueden formarse en cualquier tipo de superficie, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos (65).

Puesto que estas formaciones pueden contener microorganismos patógenos y presentan una mayor resistencia a la desinfección, se incrementan las probabilidades de contaminación del producto y de provocar infecciones alimentarias, razón por la que se considera que la presencia de biofilm en las superficies de contacto de la industria alimentaria constituye un evidente riesgo para la salud. Uno de los principales problemas en la industria alimentaria está representado por la supervivencia de microorganismos patógenos o alterantes debido a una desinfección insuficiente de las superficies o de los instrumentos en contacto con los alimentos (30).

La presencia de biofilm en estas superficies es la causa principal de contaminación del producto final. Las consecuencias de esta contaminación pueden conducir a pérdidas económicas debidas tanto al necesario rechazo del producto como, incluso, a el desarrollo de enfermedades, si intervienen microorganismos patógenos. Los biofilm formados sobre las carnes crudas y en el entorno del manipulador (superficies, utillaje, molinos, etc.) aumentan considerablemente los problemas de contaminación cruzada y de contaminaciones posteriores en el procesado. Por este motivo es preciso eliminar todos los microorganismos de las superficies en contacto con los alimentos, antes de que los contaminen y establezcan un biofilm que les servirá de reservorio (66).

Para la formación de biofilm, *E. coli* emplea flagelos, pilis y proteínas de membrana para iniciar la adhesión. Cuando ya está unida a la superficie pierde sus flagelos e incrementa la producción de sustancias poliméricas extracelulares. Algunos estudios han puesto de manifiesto que cepas de *E. coli* O157:H7 pueden desarrollar biofilm como resultado de una mayor producción de expolisacáridos y curli (67). Además, se ha demostrado que la formación de biofilm proporciona una mayor resistencia a *E. coli* cuando se expone a

soluciones de hipoclorito, uno de los desinfectantes de mayor uso en la industria alimentaria (68).

1.5 Bovinos como reservorios de *E. coli* patógenas

Numerosos trabajos señalan al bovino como el principal reservorio natural de las STEC. Esta especie es una fuente potencial para la diseminación de la bacteria al ambiente, tanto al suelo como al agua mediante la excreción de la materia fecal y la utilización del estiércol como abono. Además, los alimentos crudos de origen animal son los que tienen más probabilidad de estar contaminados, en cuanto a los productos cárnicos la principal vía de contaminación con *E.coli* patógenas ocurre durante el proceso de faenamiento en los frigoríficos cuando no se siguen las buenas prácticas de higiene. Entre los numerosos cortes de carne al por menor, la carne molida posee el mayor riesgo de que sea contaminada durante el proceso de molienda, siendo un punto de riesgo para que produzca un brote epidemiológico. Cuando la carne contaminada es adquirida por el consumidor y en su preparación para el consumo no es cocida de forma completa y por largo tiempo, ésta constituye la fuente de contaminación (21,26).

La mayoría de los brotes se producen por el consumo de alimentos contaminados. Carne mal cocida, vegetales de hoja y agua contaminados con materia fecal o estiércol proveniente de bovinos, leche no pasteurizada, frutas, yogurt, entre otros, han sido responsables de brotes y casos aislados de colitis hemorrágica y SUH (19). La transmisión directa de persona a persona también ocurre y se observa, sobre todo, en jardines maternos e infantiles, hogares para ancianos e instituciones para enfermos mentales (17).

1.6 Situación en Paraguay

Paraguay es un país agroganadero y la comercialización de la carne bovina es una actividad económica fundamental. Según las estadísticas del Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal (SENACSA), las exportaciones de carne bovina del Paraguay, de enero a diciembre de 2019 totalizaron 247.167 toneladas a un valor aproximado de US\$ 1.107 millones. Los mayores compradores del producto fueron Chile, Rusia, Israel, Brasil, Taiwán, Vietnam, Kuwait, Uruguay (69). La comercialización de la carne paraguaya a diversos países

conlleva el cumplimiento de estándares internacionales de calidad en toda la cadena de producción. Mundialmente se considera al bovino como el reservorio más importante de las *E. coli* patógenas que provocan patologías en humanos, siendo así fuente de contaminación de los alimentos al diseminar la bacteria por la materia fecal en el campo o por transferencia durante el procesamiento en frigoríficos (70).

En Paraguay, SENACSA es el organismo encargado del control de calidad de la carne de frigoríficos destinada para la exportación y el consumo de la población nacional. Dicha entidad cuenta con un programa de control microbiológico en establecimientos frigoríficos que utiliza el recuento de *E.coli* como indicador de las buenas prácticas de faena. Este indicador es una muestra del total de carga bacteriana, siendo el valor permitido hasta 10ufc/cm². Sin embargo, esta clase de métodos fenotípicos de cultivo convencional presenta la limitación de no permitir la identificación específica del tipo de *E. coli* presente, a fin de conocer si es patógena o no (71).

SENACSA reportó en el año 2011 dos rechazos de cargamentos de carne bovina paraguaya por parte de la delegación regional del Servicio Federal de Vigilancia Veterinaria de Rusia, mayor mercado de exportación de carne tipo industrial para su reutilización en hamburguesas o comidas preparadas. El primer decomiso obedeció a la detección de 100 toneladas de carne bovina contaminada con *E.coli*, cuyo costo de equivalía a un monto aproximado de 937.500 USD. La medida resultante de estos hechos fue la suspensión de exportación a Rusia por 6 meses. Al reiniciarse las negociaciones al mercado ruso redujo la cotización de la carne de 6.250 USD a 4.819 USD por tonelada. En diciembre del año 2013, SENACSA volvió a confirmar la inhabilitación temporal de 6 frigoríficos nacionales por la confederación Rusa argumentando la contaminación con bacterias; con estas plantas sancionadas Paraguay perdió el 76% de su capacidad exportadora de carne a Rusia (72,73).

Resultados previos de estudios realizados en Paraguay demostraron que la frecuencia de *E.coli* patógenas en el ganado bovino de varios departamentos del país fue elevada, detectándose en más del 90% de las muestras al menos un factor de virulencia, compatible con el patotipo STEC (73,74). En otro estudio posterior realizado por el mismo grupo de investigación, se pudo observar que los aislados STEC del ganado bovino paraguayo fueron capaces además de formar biofilm en superficies abióticas (75,76).

1.7 Plantas como agentes antibiofilm.

El uso de la medicina tradicional se encuentra ampliamente distribuido en las áreas rurales y en países con difícil acceso a la medicina moderna. Muchas de estas poblaciones poseen la cultura y conocimiento sobre las plantas medicinales como terapia ante afecciones a la salud, en este aspecto las culturas nativas son diversas y valiosas, lo que lo hace ideal para el estudio inicial en busca de nuevos fármacos. La creciente aparición de microorganismos resistentes al amplio espectro de antibióticos disponibles hasta la fecha ha renovado el interés en el estudio del potencial antimicrobiano de diversas especies de plantas que nunca antes habían sido estudiadas (77–79).

Diversas plantas han sido ampliamente utilizadas debido a sus propiedades antimicrobianas, la cual se relaciona con los fitoquímicos y metabolitos secundarios sintetizados por las mismas. Las plantas son ricas en una gran variedad de metabolitos secundarios tales como los taninos, compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides, quinonas y terpenoides, los cuales se encuentran distribuidos en todas las partes de la planta (80).

El estudio de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales es una aproximación muy utilizada en busca de compuestos que puedan ser desarrollados como antibióticos. Los mecanismos por los cuales estos extractos pueden ejercer la actividad antimicrobiana son muy diversos, entre los cuales se encuentra la capacidad de inhibir la formación de biofilm bacteriano, lo cual ha sido estudiado por diversos autores utilizando plantas distribuidas regionalmente o nativas de los países en cuestión (81–83).

En Paraguay, el departamento de Fitoquímica de la FCQ-UNA cuenta con amplia experiencia en la investigación de actividades biológicas, composición química y fitoquímica, así como también la actividad antimicrobiana de extractos de diversas plantas nativas, tanto para bacterias Gram negativas como Gram positivas e incluso para micobacterias (84–86). Sin embargo, la actividad inhibitoria de los extractos de plantas nativas del país sobre la formación de biofilm bacteriano aún no ha sido estudiada.

Este trabajo es posible gracias a la colaboración de dos grupos de investigación de instituciones de referencia del país, como lo son la FCQ y el IICS, permitiendo el acceso al biobanco de aislados STEC provenientes del ganado bovino, así como también a un banco

de extractos de plantas nativas único en el Paraguay. Este trabajo aporta los primeros datos sobre la evaluación del efecto inhibitorio de extractos de plantas nativas sobre la formación como remoción de biofilm de aislados STEC representativos, de 4 serogrupos diferentes, lo que contribuirá con la búsqueda a futuro de nuevas biomoléculas que puedan ser desarrolladas como agentes desinfectantes como también como agentes terapéuticos ante la creciente preocupación por el surgimiento de microorganismos con elevada resistencia a los antibióticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad de extractos vegetales frente al biofilm de aislados *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC)

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar la presencia de genes asociados a la formación de biofilm en aislados STEC, mediante PCR.
- Evaluar la actividad de extractos vegetales como inhibidores tanto de la formación de biofilm como del biofilm ya formado en STEC, mediante el ensayo en placa de poliestireno.
- Realizar la determinación de huella dactilar cromatográfica (*fingerprinting*) de los extractos activos por medio de cromatografía líquida acoplada a arreglo de diodos y a espectrometría de masas en tándem (LC-DAD-MS).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño del estudio

En este estudio experimental se han estudiado aislados de *E.coli* provenientes de un proyecto marco denominado “Caracterización molecular de factores de virulencia de *Escherichia coli* aislados del ganado bovino” con código de aprobación de comités científicos y de ética P06/2017 del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. La caracterización molecular y fenotípica del proyecto marco incluyó la determinación de especie por PCR del gen *16S* y pruebas bioquímicas, así como la detección por PCR de los genes *stx1* y *stx2* como de factores de virulencia accesorios codificados por los genes *eae*, *hlyA* y *saa*.

Las muestras fueron colectadas en el mes de agosto del año 2016 de bovinos aparentemente sanos pertenecientes a un establecimiento ganadero localizado en el departamento de Cordillera (Región Oriental) de Paraguay. El propietario del establecimiento fue informado sobre los objetivos y el impacto del presente proyecto de investigación y accedió voluntariamente a colaborar. El establecimiento ganadero está orientado a la reproducción y engorde de bovinos para su posterior venta a otros establecimientos ganaderos o frigoríficos ubicados en diversos puntos geográficos del país.

3.2 Selección de aislados

En el proyecto marco se analizaron un total de 1006 aislados de *E. coli* de los cuales 269 fueron identificados como STEC, éstos además fueron categorizados como formadores de biofilm mediante ensayos en placas de poliestireno en el proyecto denominado “Formación de biofilm en aislados STEC provenientes de muestras de materia fecal de ganado bovino del Departamento de Cordillera del Paraguay en el año 2016” con código de aprobación de los comités científico y ética P10/2017 (Anexo 1).

Para el presente estudio se seleccionaron 4 aislados STEC representativos, categorizados previamente como fuertes formadores de biofilm de serogrupos representativos, determinados en la caracterización previa citada en los proyectos marco. La selección de los aislados STEC para el estudio se indica en la figura 2.

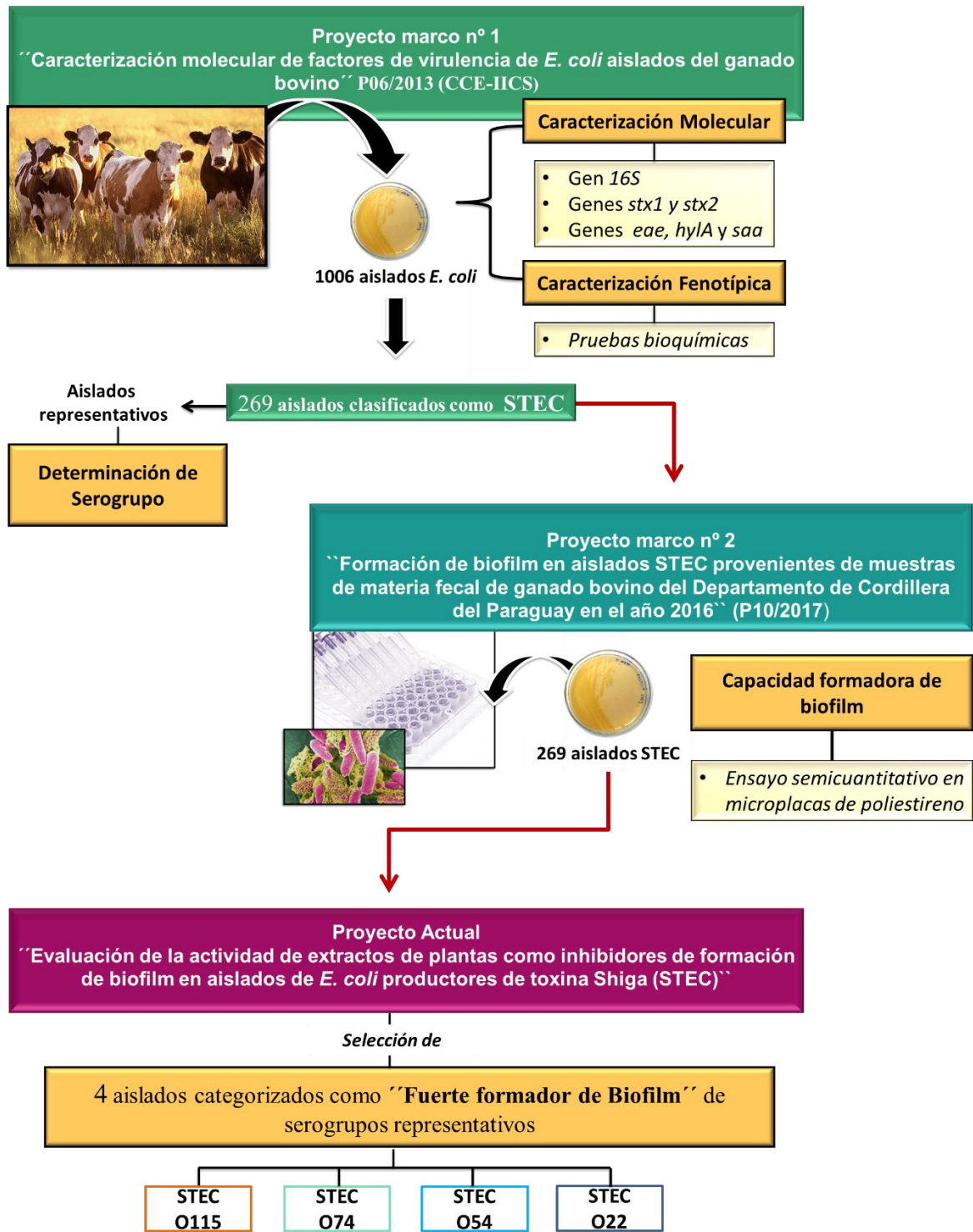


Figura 2. Flujograma de selección de aislados STEC

Los aislados seleccionados junto con sus características se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Características de los aislados STEC estudiados.

Serogrupo	Toxina Shiga ^a	Factores de Virulencia ^b	Capacidad formadora de biofilm
O115	<i>stx1</i>	<i>saa</i>	Fuerte
O54	<i>stx1/stx2</i>	<i>hlyA/saa</i>	Fuerte
O22	<i>stx2</i>	<i>saa</i>	Fuerte
O74	<i>stx1/stx2</i>	<i>hlyA/saa</i>	Fuerte

^a *stx1*: gen codificante de la Toxina Shiga 1; *stx2*: gen codificante de la Toxina Shiga 2

^b *saa*: gen codificante de adhesina autoaglutinante; *hlyA*: gen codificante de enterohemolisina.

Dichos aislados se encuentran debidamente codificados y criopreservados a -80 °C en medio BHI con glicerol en el biobanco del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS).

3.3 Selección de extractos vegetales

Los extractos naturales que fueron evaluados como inhibidores de biofilm, provienen de un banco de extractos generados por el equipo de investigación del departamento de fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, constituido por un total de 70 extractos metanólicos provenientes de especies diferentes. Se seleccionaron 20 extractos vegetales teniendo en cuenta aquellos géneros de plantas en los cuales se encontraron referencias bibliográficas de actividad antimicrobiana o que pertenecían a familias productoras de alcaloides con potencial actividad antimicrobiana, que se listan en la tabla 2. Esta colección de extractos es única en el país en su tipo y por tanto corresponde a una fortaleza de este estudio.

La extracción de los vegetales fue realizada con metanol como solvente de extracción por poseer el efecto de co-solvencia con los compuestos que se encuentran en el extracto vegetal, logrando extraer una diversidad de metabolitos de carácter polares, medianamente polares y apolares. Además, por tratarse de un solvente altamente volátil, se facilita el concentrado del extracto en el equipo de evaporador rotatorio.

Los extractos se resuspendieron en dimetilsulfóxido (DMSO, AppliChem, Alemania) utilizando vórtex para su disolución completa; para obtener soluciones madre de 400 mg/mL. Las diluciones de los extractos empleadas en los ensayos se prepararon con DMSO, fueron

conservadas a resguardo de la luz y congeladas a -20°C hasta su uso. Los extractos incluidos en este trabajo se listan en la tabla 2.

Tabla 2. Nombre científico o común, partes de las plantas utilizadas y familia a la que pertenece

Nombre Científico	Nombre común	Parte empleada	Familia	Ref.
<i>Pterocaulon alopecuroides (Lam.)DC.</i>	Toro ka'ã morotĩ	Aérea florida	<i>Asteraceae</i>	(87)
<i>Ocotea diospyrifolia</i>	Laurel morotĩ	Hoja	<i>Lauraceae</i>	(88)
<i>Eupatorium ivifolium L.</i>	Typycha pito	Aérea florida	<i>Asteraceae</i>	(89)
<i>Hyptis brevipes</i>	Menta brava	Aérea	<i>Lamiaceae</i>	(90)
<i>Aegiphila brachiata Vell.</i>	Jagua ra'yi	Aérea	<i>Lamiaceae</i>	(91)
<i>Tessaria dodoneifolia (Hook. & Arn.)</i>	Chilca dulce	Aérea	<i>Asteraceae</i>	(92)
<i>Hyptis mutabilis</i>	Kavara ka'ã	Aérea	<i>Lamiaceae</i>	(93)
<i>Croton bonplandianum</i>	Tortola rembi'u	Aérea	<i>Euphorbiaceae</i>	(94)
<i>Pterocaulon angustifolium</i>	Toro ka'ã	Aérea florida	<i>Asteraceae</i>	(95)
<i>Acanthospermum australe (Loef.)</i>	Tapekue	Entera	<i>Asteraceae</i>	(88)
<i>Serjania minutiflora Radlk.</i>	Ysypo timbo	Aérea	<i>Sapindaceae</i>	(89)
<i>Cadiospermum grandiflorum Sw.</i>	Ysypó kamambú	Aérea florida	<i>Sapindaceae</i>	(96)
<i>Luehea divaricata</i>	Ka'a ovetí	Sumidad florida	<i>Tilaceae</i>	(84)
<i>Allophylus edulis</i>	Kokũ	Hoja	<i>Sapindaceae</i>	(97)
<i>Genipa americana</i>	Ñandypa	Hoja	<i>Rubiaceae</i>	(98)
<i>Aloysia virgata var. Platiphylla</i>	Almendro dulce	Aérea florida	<i>Verbenaceae</i>	(99)
<i>Aloysia gratissima</i>	Poleo'i	Aérea	<i>Verbenaceae</i>	(99)
<i>Centratherum punctatum</i>	Typycha botõ	Aérea	<i>Asteraceae</i>	(100)
<i>Solidago chilensis</i>	Mbu'y sa'yju	Raíz	<i>Asteraceae</i>	(101)
<i>Sidastrum paniculatum</i>	Malva hũ	Raíz	<i>Malvaceae</i>	(102)

3.4 Flujograma general de trabajo

Primeramente, se realizó la detección de los genes *fimH*, *flu* y *csgA* mediante PCR en los 4 aislados STEC de serogrupos diferentes, clasificados como fuertes formadores de biofilm, detallado en el ítem **3.6**.

Para la evaluación de la actividad inhibidora o removedora de biofilm por parte de los extractos vegetales, fue necesario emplear concentraciones sub-inhedoras de los mismos, de manera a garantizar que los efectos observados no se deban a una inhibición del crecimiento bacteriano sino de la actividad antibiofilm *per se*. Por este motivo se determinó de forma semicuantitativa la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada uno de los 20 extractos vegetales estudiados en los 4 aislados STEC, como se detalla en el ítem **3.7**.

Luego de determinar la CMI de los extractos, fue seleccionada la concentración sub-inhedoras de 10mg/mL como partida para la realización de los ensayos de inhibición y remoción de biofilm frente a los 4 aislados STEC en pruebas individuales, detallada en el apartado **3.8**.

Para aquellos extractos vegetales que resultaron poseer actividad inhibidora o removedora de biofilm en los 4 aislados STEC, se evaluó además el efecto dosis- respuesta de estos, para la cual se realizaron diluciones seriadas a concentraciones iguales a 2mg/mL, 1mg/mL, 0,2mg/mL y 0,1mg/mL.

Por último, fueron seleccionados los extractos que resultaron poseer tanto actividad inhibidora como removedora de biofilm en los 4 aislados STEC para la determinación de la huella dactilar cromatográfica por medio de cromatografía líquida acoplada a arreglo de diodos y a espectrometría de masas en tándem (LC-DAD-MS) como se detalla en el ítem **3.9**. **(Figura 3)**

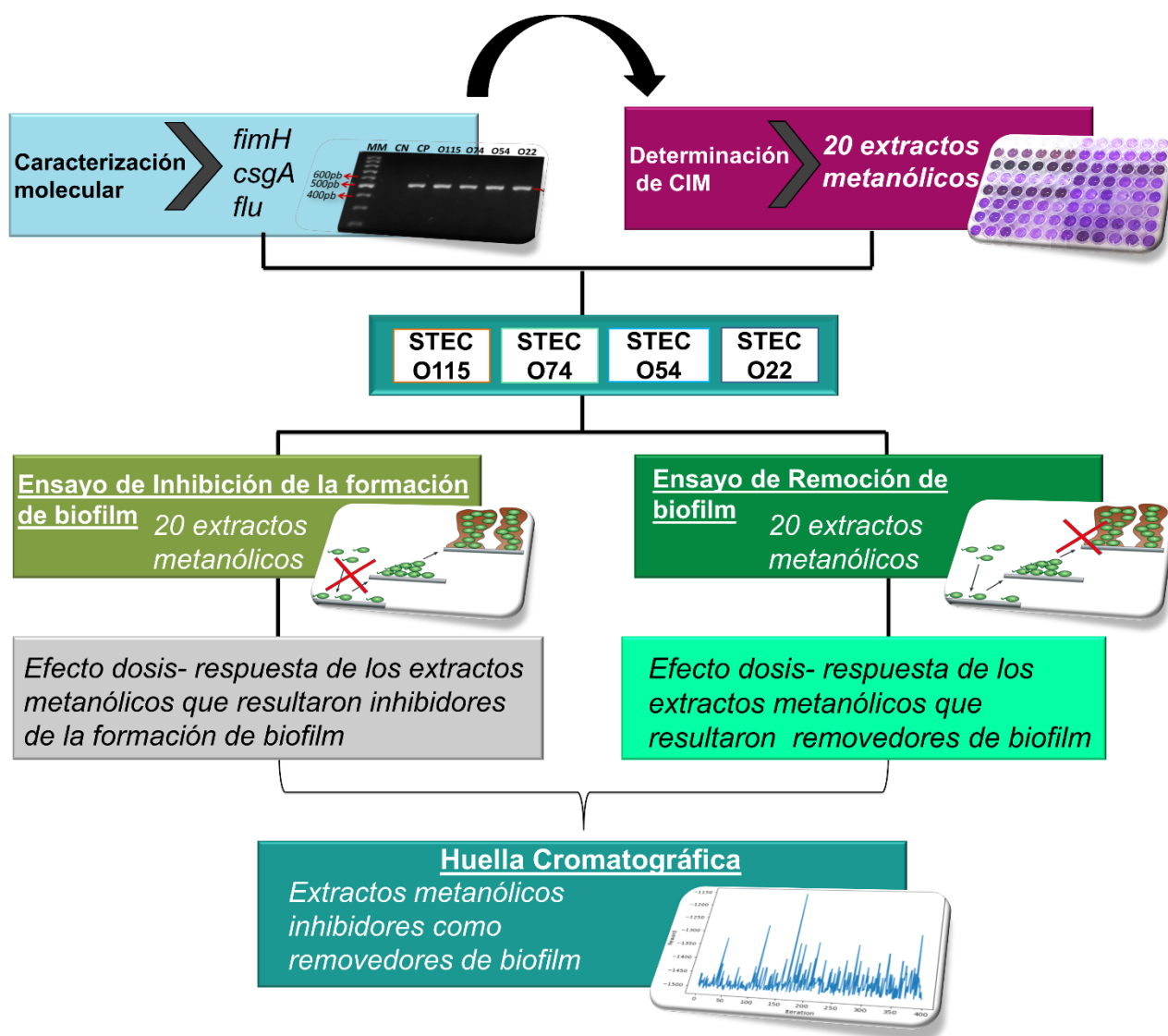


Figura 3. Flujograma general de trabajo con 4 aislados STEC y 20 extractos vegetales.

3.5 Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y conservación

3.5.1 Medios de cultivo

El medio de cultivo LB-ágar (Luria Bertani), se empleó como medio de crecimiento y aislamiento de STEC. La composición de este es 1% de triptona (Oxoid, Inglaterra), 0,5% de extracto de levadura (BD, Francia), 1% de NaCl (Merck, Alemania), ajustando el pH a 7 con NaOH (Biopack, Argentina).

Para el ensayo de inhibición de biofilm en microplacas de poliestireno se empleó el medio de cultivo TSB (caldo de Triptona-Soja) (Becton, Dickinson and Company, USA).

3.5.2 Condiciones de crecimiento

Las muestras cultivadas en el medio líquido o en placas con agar fueron crecidas incubando en la estufa (Memmert, Alemania) a 37°C por 24 horas.

3.5.3 Conservación

Los aislados STEC fueron debidamente codificados y criopreservados a -80°C en medio infusión cerebro corazón (BHI) con 15% de glicerol, en el biobanco del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS), como parte del proyecto marco.

3.6 Caracterización genotípica

3.6.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN de los aislados crecidos en medio agar LB se realizó por el método de ebullición, que consistió en resuspender las colonias crecidas, recolectados con el ansa en 300µL de agua estéril y llevar a ebullición por 10 minutos, luego se procedió a la centrifugación de estas por 5 minutos a 13.000 rpm. El sobrenadante que contuvo el ADN fue conservado a -20°C.

3.6.2 PCR para la detección de genes asociados a la formación de biofilm

Se incluyeron genes asociados a la formación de biofilm en *E.coli*, tales como el gen *fimH* que codifica la proteína fimbria tipo 1 esencial para la unión del biofilm a la superficie, el gen *flu* implicado en la autoagregación entre las células bacterianas y por último el gen *csgA* que codifica la proteína Curli encargado de la formación de un biofilm más complejo y estable. La detección de estos genes fue realizada para los cuatro aislados incluidos en el estudio.

a) Gen *fimH*

Se realizó la detección del gen *fimH* por medio de PCR convencional. Se utilizó el protocolo descrito por Jhonson y colaboradores (103) con algunas modificaciones que se describen a continuación. El producto generado fue un fragmento de ADN de 508 pb.

Las condiciones de la mezcla para cada reacción de PCR fueron las siguientes: solución buffer 1X (Invitrogen, USA), MgCl₂ 4 mM (Invitrogen, USA), dNTP 0,2 mM (Promega, USA), primers para el gen *fimH* 0,6 μM (Macrogen, Corea), Taq polimerasa 1U (Invitrogen, USA). El volumen final de la reacción fue de 25 μL conteniendo 2,5 μL de muestra de ADN como molde.

Las condiciones de termociclado son las siguientes: 25 ciclos de 95°C por 4 minutos inicialmente, luego 95°C por 30 segundos, 63°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, un paso final de 10 minutos a 72°C. Se empleó el termociclador Veriti AppliedBiosystems (Thermo Fischer Scientific, USA). Para cada tanda de reacción de PCR se emplearon controles positivos y negativos, los controles positivos consistieron en cepas STEC ya identificadas como portadoras de dicho gen mediante secuenciación, realizado en un estudio previo (104). Los controles negativos consistieron en la mezcla de todos los componentes de la reacción, excepto el ADN molde.

b) Gen *flu*

La detección del gen *flu* se realizó por PCR convencional, utilizando la metodología descrita por Ristieri y colaboradores (62). El producto generado fue un fragmento de ADN de 433 pb. Los reactivos utilizados y sus concentraciones fueron las siguientes: solución buffer 1X (Invitrogen, USA), MgCl₂ 2 mM (Invitrogen, USA), dNTP 0,2 mM (Promega, USA), primers para el gen *flu* 0,25 μM (Macrogen, Corea), Taq polimerasa 1U (Invitrogen, USA). El volumen final de la reacción fue de 25 μL conteniendo 2,5 μL de muestra de ADN como molde.

Las condiciones de termociclado fueron 30 ciclos de 95°C inicialmente por 1 minuto, luego 95°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto 20 segundos, un paso final de 10 minutos a 72 °C. Se empleó el termociclador Veriti AppliedBiosystems (Thermo Fischer Scientific, USA). Para cada reacción de PCR se emplearon controles positivos, que para la reacción descrita correspondió a la cepa de *E. coli* EDL933. El control negativo consistió en la mezcla de todos los componentes de la reacción, con excepción del ADN molde.

c) Gen *csgA*

Se realizó la detección del gen *csgA* por medio de PCR convencional. Se utilizó el protocolo descrito por Maurer y colaboradores (63) con algunas modificaciones que se describen a continuación. El producto generado fue un fragmento de ADN de 200 pb.

Las condiciones de la mezcla para cada reacción de PCR fueron las siguientes: solución buffer 1X (Invitrogen, USA), MgCl₂ 2 mM (Invitrogen, USA), dNTP 0,2 mM (Promega, USA), primers para el gen *csgA* 0,5 μM (Macrogen, Corea), BSA 0,0025mg/ml (Invitrogen, USA), Taq polimerasa 1U (Invitrogen, USA). El volumen final de la reacción fue de 25 μL conteniendo 2,5 μL de muestra de ADN como molde.

Las condiciones de termociclado son las siguientes: 30 ciclos de 94°C por 3 minutos inicialmente, seguido de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, un paso final de 5 minutos a 72°C. Se empleó el termociclador Veriti AppliedBiosystems (Thermo Fischer Scientific, USA). Para cada tanda de reacción de PCR se emplearon controles positivos y negativos. Los controles positivos consistieron en cepas STEC ya identificadas como portadoras de dicho gen mediante secuenciación, realizado en un estudio previo. Los controles negativos consistieron en la mezcla de todos los componentes de la reacción, excepto el ADN molde.

3.6.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos amplificados se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (VWR Life Science, USA) con corridas de 30 minutos a 110 Volts; empleando un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, USA). Se utilizó SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, USA), el cual se intercala con las bases nitrogenadas del ADN y emite fluorescencia al ser expuesto a luz UV, permitiendo así la observación de los amplicones. Las fotografías de los geles fueron tomadas con una cámara Canon Power Shot G16 (Canon Inc., Japón) en un transiluminador UV (mrc Lab, USA).

3.7 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los 20 extractos vegetales.

Se empleó el método de determinación de CIM semicuantitativa colorimétrica en microplacas de poliestireno de fondo plano, el cual se fundamenta en la capacidad de óxido-reducción del indicador de viabilidad celular resazurina, el cual debido al microambiente reducido generado por el crecimiento celular pasa de su estado oxidado (azul) a su forma reducida (rosa); descrito por Sarker *et al.* (105), con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

Para la preparación del inóculo bacteriano se cultivaron los aislados de STEC en medio LB agar y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se preparó una suspensión bacteriana de cada aislado en medio TSB (Becton, Dickinson and Company, USA) equivalente a 0.5 en la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL) determinado con un densitómetro (Grant Bio, Fisher Scientific, USA). Estas suspensiones fueron diluidas en un segundo paso en medio TSB hasta una concentración de 5×10^5 UFC/mL, utilizándose esta dilución como inóculo bacteriano (Figura 4).

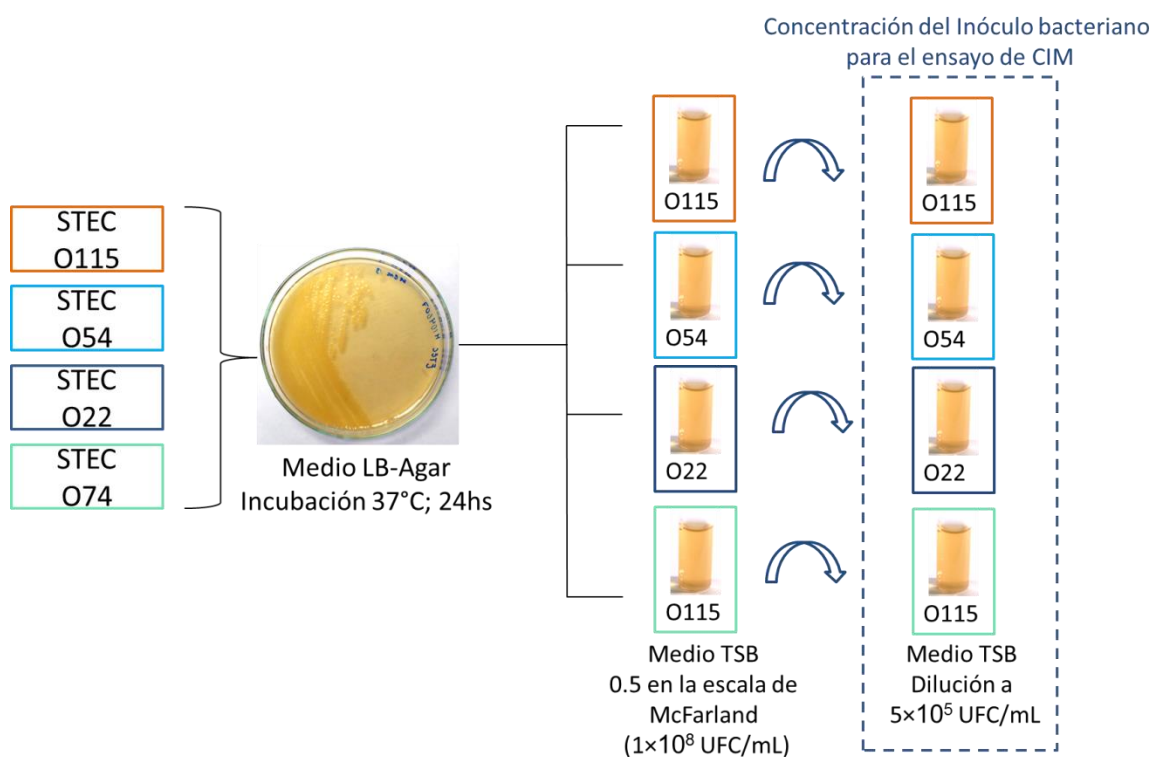


Figura 4. Preparación de inóculo bacteriano para el ensayo de CIM

Las concentraciones de los extractos vegetales testados partieron de 40 mg/mL y del antibiótico gentamicina utilizado como control de inhibición del crecimiento se partió de la concentración inicial de 2 mg/mL. Se realizaron diluciones seriadas al medio de los extractos generando un rango de concentraciones desde 40 mg/mL hasta 0,15 mg/mL, para luego agregar el inóculo bacteriano hasta un volumen final de 100 μ L en cada pocillo, seguido de incubación a 37°C por 24 hs.

Como controles se emplearon caldo tripticasa soya (TSB, Becton, Dickinson and Company, USA) con 10% de DMSO (AppliChem, Alemania) tanto con inóculo (control de crecimiento bacteriano) como sin inóculo bacteriano (control de esterilidad); utilizados como patrones para comparar los cambios de coloraciones en los grupos de ensayo y determinar los puntos de corte. Además, se realizó como control un blanco de extracto que consistió en el medio TSB más DMSO con la concentración más alta testada del extracto vegetal correspondiente para verificar el efecto que el mismo pueda tener en la coloración de la resazurina. Los ensayos fueron realizados por duplicado para cada extracto.

Luego de la incubación se añadieron 10 μ L de resazurina (Sigma Aldrich, USA) a cada pocillo y se volvió a incubar a 37°C por 24 hs, el cambio de coloración de azul a rosa fue interpretado como crecimiento bacteriano, la CIM asignada fue la concentración más baja a la cual no ocurrió el cambio de coloración (Figura 5)

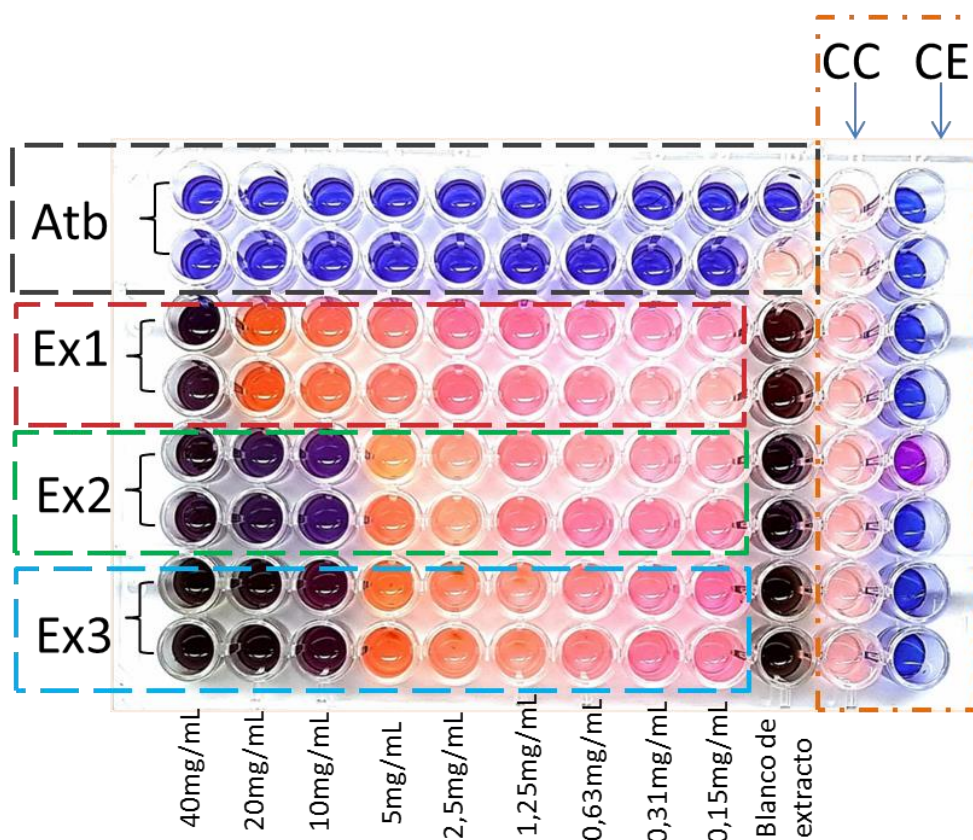


Figura 5. Ensayo de determinación de CIM para extractos vegetales metanólicos. ATB: Gentamicina; CC: control de crecimiento; CE: control de esterilidad; Ex1,2,3: Extracto vegetal 1, 2, 3 respectivamente.

3.8 Ensayo de inhibición y remoción de biofilm

a. Ensayo de inhibición de formación de biofilm

Se empleó el método descrito por Stepanovic *et al.* (106) fundamentado en la formación y fijación del biofilm en los pocillos de la microplaca de poliestireno de fondo plano, y la tinción del mismo con cristal violeta; con algunas modificaciones que se detallan a continuación.

A partir de cultivos en medio LB-agar de 24 horas se preparó el inóculo bacteriano para cada aislado STEC, preparando una suspensión bacteriana de 0.5 en la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL) en medio TSB (Becton, Dickinson and Company, USA).

Los pocillos de la placa de poliestireno fueron preparados previamente con medio TSB fresco más una dilución de cada extracto a una concentración final de 10 mg/mL en cada pocillo, correspondiente a la concentración sub-inhibitoria para los 20 extractos testados.

Seguidamente se agregó el inóculo bacteriano a cada pocillo según correspondía y se incubó la placa a 37°C por 24 horas. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado para cada extracto.

Posteriormente se realizaron tres pasos de lavado con PBS para eliminar las células planctónicas (células libres que no formaron biofilm), un paso de fijación del biofilm con etanol al 96% (J.T.Baker, USA), seguido del secado de la placa y tinción con cristal violeta al 0,1% (Anedra, Argentina) por 30 min, lo cual tiñe el biofilm formado. Luego de tres pasos de lavado con agua destilada para eliminar el exceso de cristal violeta, se procedió a la elución del colorante con una mezcla de etanol/acetona (70:30) (Cicarelli, Argentina) con agitación constante por 30 min en un agitador automático (Nahita Blue, España). (Figura 6)

Para cada ensayo se emplearon blanco de medio de cultivo sin inóculo bacteriano como control de esterilidad; blanco de medio TSB con DMSO al 10% para eliminar el efecto de la absorbancia correspondiente al medio de cultivo con DMSO; un blanco de TSB con el extracto a la concentración ensayada correspondiente, con el propósito de contrarrestar el efecto de la absorbancia producida por cada extracto; y un control negativo que consistió en medio TSB con DMSO al 10% más el inóculo bacteriano (sin tratamiento con extracto) (Tabla 3). La disposición de la placa de poliestireno del ensayo se detalla en la figura 7.

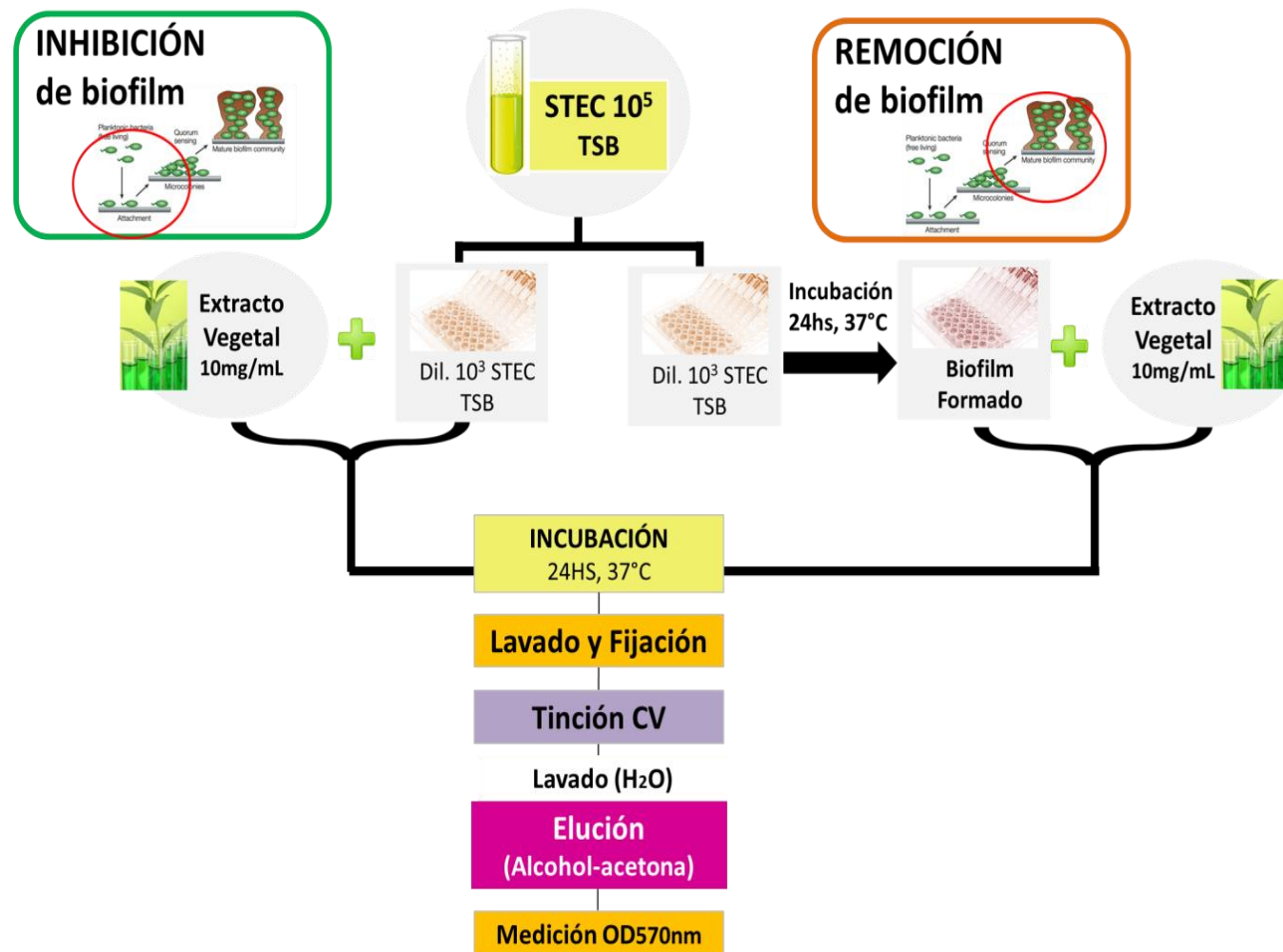


Figura 6. Flujograma de los ensayos de inhibición y remoción de biofilm de STEC por actividad de extractos vegetales

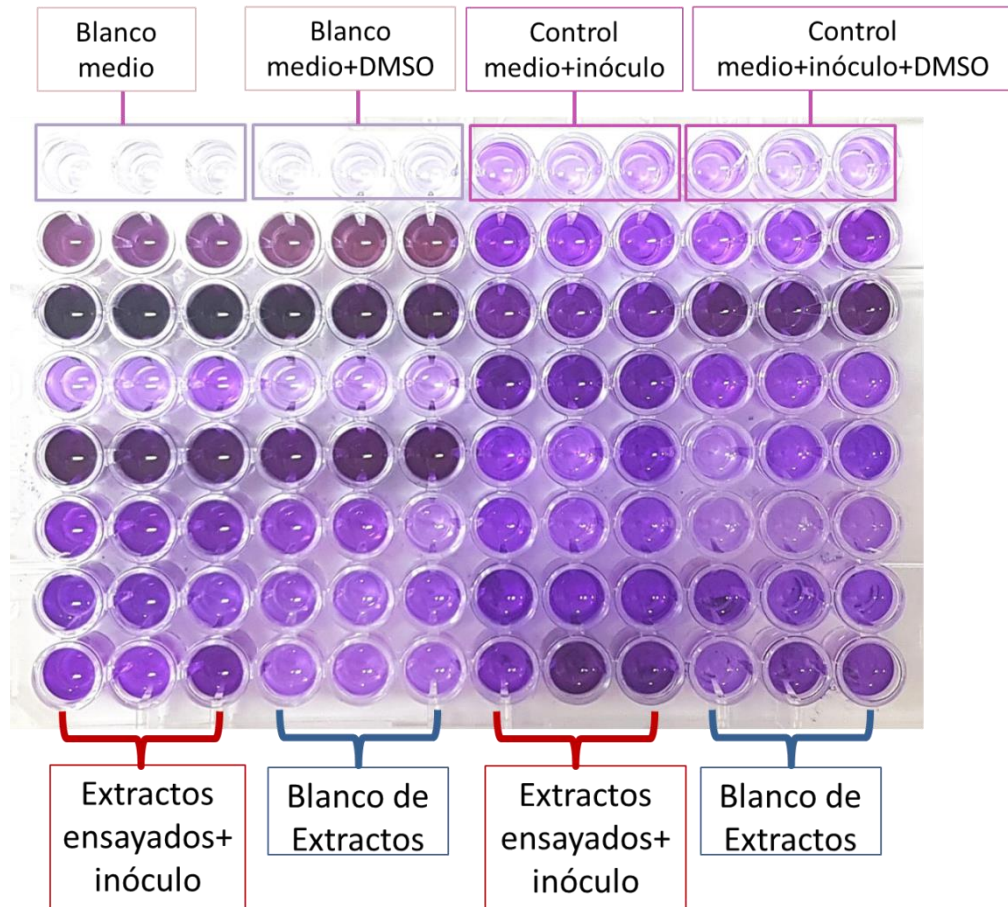


Figura 7. Ensayo de inhibición de la formación de biofilm utilizando extractos vegetales. Para los grupos de ensayo y los blancos de extracto, cada fila por triplicado corresponde a un extracto diferente.

La lectura de la densidad óptica (OD) fue realizada a 570 nm en un lector de placas de ELISA (Multiskan GO, ThermoFisher Scientific, Finlandia).

El porcentaje de inhibición de cada extracto fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición o remoción} = \frac{OD_{570 \text{ nm}}(\text{Control}) - OD_{570 \text{ nm}}(\text{Muestra})}{OD_{570 \text{ nm}}(\text{Control})} \times 100$$

Tabla 3: Blancos utilizados en los ensayos de inhibición y remoción de biofilm.

Tipo de blancos	Descripción	Función
Blanco medio	Medio de cultivo sin inóculo bacteriano	Control de esterilidad
Blanco medio + DMSO	Medio de cultivo con 10% de DMSO (diluyente del extracto metanólico)	Eliminar el efecto de la absorbancia correspondiente al medio de cultivo con el DMSO
Blanco medio + inóculo	Medio de cultivo con inóculo bacteriano	Control de formación de biofilm sin tratamiento inhibitor o removedor.
Blanco medio + inóculo + DMSO	Medio de cultivo con inóculo bacteriano y 10% de DMSO.	Control de formación de biofilm sin tratamiento inhibitor o removedor. Verificar el efecto del DMSO
Blanco extractos	Medio de cultivo con el extracto metanólico a la concentración testada	Eliminar el efecto de la absorbancia producida por cada extracto.

b. Ensayo de remoción de biofilm

Para el ensayo de remoción del biofilm ya formado se procedió de la misma manera que lo descrito anteriormente para el ensayo de inhibición de la formación de biofilm en el ítem 3.8.a, a diferencia que el agregado de los extractos naturales se realizó posterior a la formación del biofilm por las paredes de la placa de poliestireno en medio TSB no suplementado con extractos naturales, para que el efecto observado sea sobre el biofilm ya formado y no así sobre el proceso de formación del mismo (figura 6).

El promedio de las absorbancias correspondientes a los pocillos de control de esterilidad fue sustraído tanto al promedio de las absorbancias del Control Negativo, como al promedio de las absorbancias de los grupos experimentales, a fin de eliminar el efecto de la absorbancia correspondiente al medio TSB. Así mismo, el promedio de las absorbancias de los pocillos del blanco de extracto fue sustraído al promedio de las absorbancias del grupo experimental del extracto correspondiente, a fin de eliminar el efecto de la absorbancia producida por cada extracto. Los datos obtenidos luego de este procesamiento fueron utilizados para el cálculo del porcentaje de inhibición o remoción por medio de la fórmula descrita.

Los porcentajes de inhibición o remoción con signo positivo indican una inhibición o remoción del biofilm, mientras que los porcentajes con signo negativo indican una inducción o fijación del biofilm. Se han descrito dos criterios para clasificar a los porcentajes de inhibición y remoción de biofilm, por una parte, según Famuyide *et al.*, los extractos que presentan un porcentaje de inhibición igual o superior al 50% se consideran extractos con

una buena actividad inhibitoria, en tanto que los extractos con porcentaje inferiores se consideran sin actividad inhibitoria (107).

Por otro lado, Yuyama *et al.*, señalan que la actividad inhibitoria de la formación de biofilm se considera como elevada en un rango de 70-100%, buena en el rango de 40-69% y moderada en el rango de 20-39%, mientras que porcentajes inferiores al 20% se consideran inactivos contra la formación de biofilm (108).

En este trabajo hemos optado por emplear el criterio más exigente, el cual considera que los extractos poseen actividad inhibitoria sobre la formación de biofilm a partir de porcentajes del 50%, además hemos clasificado la actividad de estos extractos como buena (50-69%) o elevada (70-100%). Este criterio fue también aplicado para clasificar los porcentajes que demostraron una actividad inductora sobre la formación de biofilm.

c. Ensayos de inhibición y remoción de biofilm a diferentes concentraciones de extracto

Para aquellos extractos que presentaron actividad inhibitoria de formación o removedora de biofilm a la concentración inicial testada (10mg/mL), se procedió a la realización de diluciones seriadas al medio (1:2) de extractos y repetición de los ensayos tanto de inhibición como remoción de biofilm frente a los 4 aislados en estudio, para describir el efecto de la dosis sobre la actividad del extracto. Las concentraciones de las diluciones seriadas testadas fueron de 2mg/mL, 1mg/mL, 0,2mg/mL y 0,1mg/mL.

3.9 Determinación de la huella dactilar cromatográfica de los extractos vegetales con actividad inhibitoria y removedora de biofilm.

La determinación de la huella dactilar cromatográfica permite detectar los metabolitos secundarios presentes en cada extracto en el momento que se obtuvieron las muestras vegetales para su estudio, de manera a conocer la identidad de los compuestos que ejercen la acción inhibitoria o removedora en el biofilm, en vista a estudios futuros que surjan de este proyecto poder realizar un análisis adecuado.

Los extractos fueron analizados por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas y arreglo de diodos para la detección de los metabolitos secundarios presentes.

Para ello se utilizaron una columna Kinetex EVO C18 de 100 x 2.1 mm x 1.7 μm (diámetro de partícula) (Microclar, Argentina). Como fase móvil se empleó un gradiente de agua y acetonitrilo (0,1% HCOOH) (Merck, Alemania) y el flujo fue de 0,3 mL/min. La ionización se realizó por electrospray en modo positivo y negativo y los voltajes de ajustaron individualmente para cada extracto para tener la mejor respuesta posible. En cuanto al detector de matriz de fotodiodos (PDA), se utilizó la región comprendida entre 200 y 800 nm con monitoreo a 254 nm.

3.10 Asuntos estadísticos

Los datos obtenidos fueron almacenados en bases de datos utilizando planillas electrónicas Excel (Microsoft Office Standard 2016) y fueron procesados y analizados mediante estadística descriptiva.

3.11 Consideraciones éticas

El proyecto actual fue sometidos a consideración de los Comités Científico y de Ética del IICS, y fue aprobado con código P24/2019 (Anexo 2).

La manipulación y desechos de los materiales biológicos como de los reactivos que se utilizaron para dicho estudio se realizaron según normas de bioseguridad establecidas en los protocolos del laboratorio, velando siempre que dichos procedimientos no atenten contra la salud del personal como del medio ambiente.

El banco de extractos naturales forma parte del trabajo de investigación del grupo del Dpto. de Fitoquímica de la FCQ y la evaluación de la actividad inhibitoria o removedora de biofilm no conlleva conflictos de interés respecto a los objetivos de la creación del banco de extractos.

Los aislados STEC criopreservados en el biobanco del IICS fueron obtenidos en el marco del proyecto titulado “Caracterización molecular de factores de virulencia de

Escherichia coli aislados del ganado bovino'' y cuentan con aprobación de comités científico y de ética de la institución. Los trabajos publicados a partir del presente proyecto conllevarán el respeto de la autoría y la posición de acuerdo con la contribución de cada investigador participante.

4. RESULTADOS

4.1 Portación de genes asociados a la formación de biofilm

Los aislados de STEC de serogrupos O54, O22 y O74 analizaros mostraron portar de forma simultánea los genes *fimH*, *flu* y *csgA*. Mientras que en el aislado de serogrupo O115 se detectaron sólo los genes *fimH* y *csgA* (**Figura 8**).

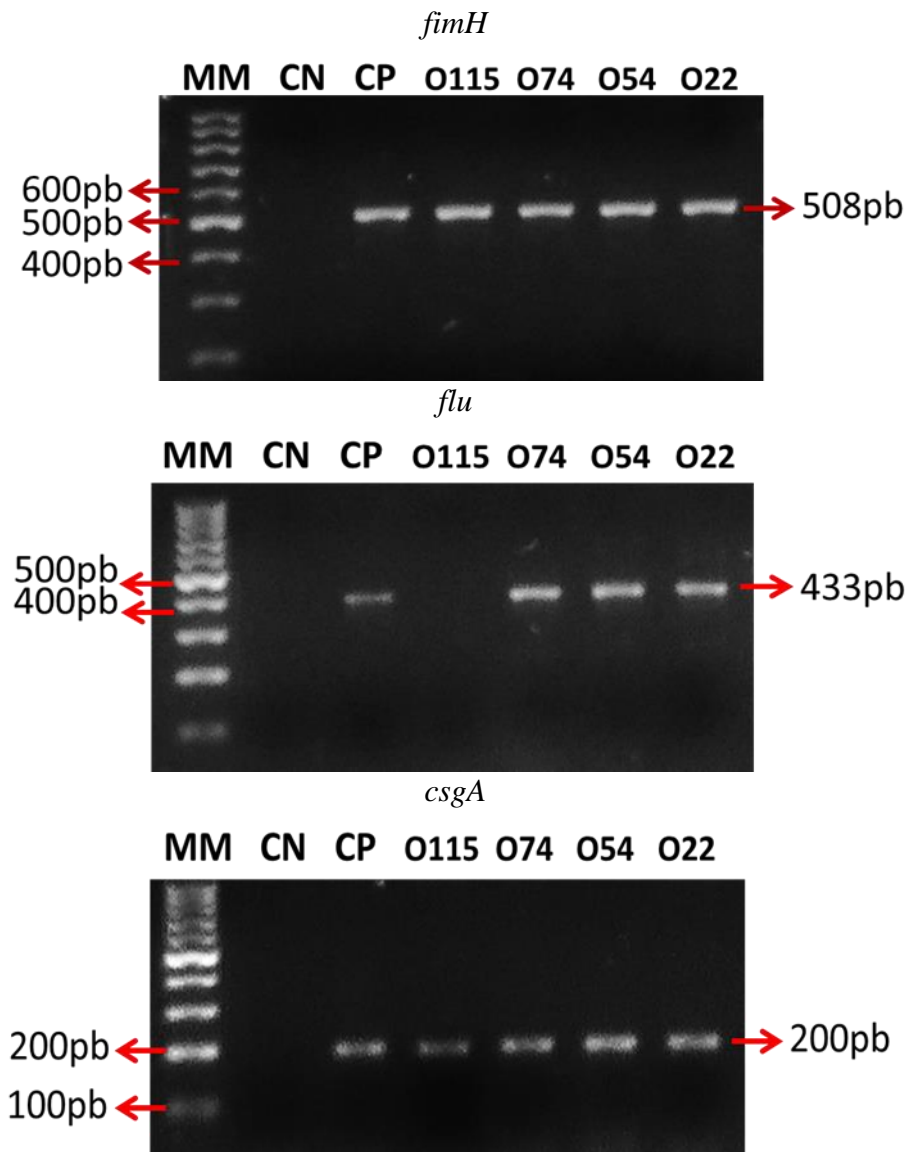


Figura 8. Detección de los genes *fimH*, *flu* y *csgA*. Electroforesis en gel de agarosa al 2%. **Carril 1:** marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler, ThermoFisher Scientific, USA). **Carril 2:** control negativo. **Carril 3:** control positivo. **Carril 4 al 7:** aislados STEC.

En la tabla 4 se resumen las características de los aislados estudiados respecto a los factores de virulencia que portan como también respecto a su capacidad formadora de biofilm.

4.2 Portación de factores de virulencia con respecto a los perfiles genéticos de biofilm en aislados STEC.

Del análisis genotípico de los aislados STEC proveniente de ganado bovino para los genes *fimH*, *flu* y *csgA* se detectaron 2 perfiles genéticos distintos. Los hallazgos en relación con la portación de los demás factores de virulencia han sido los siguientes: **(Tabla 4)**.

Los aislados STEC de serogrupos O54 y O74 portan genes codificantes de ambas toxinas Shiga y hemolisinas.

El aislado STEC de serogrupo O22 resultó ser portador de 5 de los 7 genes analizados.

El aislado STEC de serogrupo O115 resultó ser portador de 4 de los 7 genes analizados.

Tabla 4: Características de los aislados STEC estudiados

Serogrupo	Toxina Shiga ^a	Factores de Virulencia ^b	Capacidad formadora de biofilm	Genes de biofilm ^c		
O115	<i>stx1</i>	<i>saa</i>	Fuerte	<i>fimH</i>	-	<i>csgA</i>
O54	<i>stx1/stx2</i>	<i>hlyA/saa</i>	Fuerte	<i>fimH</i>	<i>flu</i>	<i>csgA</i>
O22	<i>stx2</i>	<i>saa</i>	Fuerte	<i>fimH</i>	<i>flu</i>	<i>csgA</i>
O74	<i>stx1/stx2</i>	<i>hlyA/saa</i>	Fuerte	<i>fimH</i>	<i>flu</i>	<i>csgA</i>

^a *stx1*: gen codificante de la Toxina Shiga 1; *stx2*: gen codificante de la Toxina Shiga 2

^b *saa*: gen codificante de adhesina autoaglutinante; *hlyA*: gen codificante de enterohemolisina.

^c *fimH*: gen codificante de Fimbria tipo 1; *flu*: gen codificante de proteínas autoagregativas; *csgA*: gen codificante de la proteína curli.

4.3 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Los resultados de la determinación de la CIM de los 20 extractos vegetales metanólicos estudiados, para los cuatro aislados STEC seleccionados se resumen en la tabla 5.

La CIM de los 20 extractos metanólicos frente a los 4 aislados STEC resultó comprendida entre los valores de 20mg/mL y superior a 40mg/mL. Para los que resultaron superiores a 40 mg/mL no fue necesario el valor exacto de la CIM debido a que el objetivo principal de este ensayo era establecer una concentración subinhibitoria de partida, con la cual realizar los ensayos de inhibición y remoción de biofilm.

En general se observó que la mayoría (77,5%) de los extractos resultó con valores de CIM entre 40mg/mL y superior a 40mg/mL frente a los aislados en estudio.

Las variaciones en el efecto antimicrobiano de un mismo extracto frente a los 4 aislados STEC para los 20 extractos testados se mantuvieron en el orden de una a dos diluciones

De acuerdo con los valores resultantes se eligió la concentración de 10mg/mL como concentración sub-inhibitoria para todos los extractos en estudio.

Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) en mg/mL de los extractos vegetales metanólicos contra serogrupos de STEC.

Nombres Científicos	STEC O115	STEC O74	STEC O54	STEC O22
<i>Pterocaulon alopecuroides (Lam.) DC.</i>	40	>40	>40	>40
<i>Ocotea diospyrifolia</i>	>40	20	>40	20
<i>Eupatorium ivifolium L.</i>	20	40	>40	40
<i>Hyptis brevipes</i>	20	>40	20	>40
<i>Aegiphila brachiata Vell.</i>	40	20	40	40
<i>Tessaria dodoneifolia (Hook. & Arn.)</i>	>40	40	>40	40
<i>Hyptis mutabilis</i>	20	20	20	>40
<i>Croton bonplandianum</i>	>40	20	40	40
<i>Pterocaulon angustifolium</i>	40	>40	>40	>40
<i>Acanthospermum australe (Loef.) Kuntze</i>	>40	40	40	40
<i>Serjania minutiflora Radlk.</i>	20	>40	>40	>40
<i>Cadiospermum grandiflorum Sw.</i>	>40	20	40	40
<i>Luehea divaricata</i>	>40	20	40	40
<i>Allophylus edulis</i>	>40	40	>40	40
<i>Genipa americana</i>	40	40	>40	40
<i>Aloysia virgata var. Platiphylla</i>	40	>40	20	20
<i>Aloysia gratissima</i>	40	>40	20	>40
<i>Centratherum punctatum</i>	>40	40	40	40
<i>Solidago chilensis</i>	>40	40	>40	40
<i>Sidastrum paniculatum</i>	>40	20	40	20

Se determinaron CIM (mg/mL), con valores expresados como promedio de ensayos por duplicado. CIM = la concentración más baja de metabolitos vegetales (mg/-mL) que inhibió el crecimiento bacteriano.

4.4 Determinación del efecto inhibitorio de los extractos vegetales sobre la formación de biofilm

La capacidad de los extractos vegetales metanólicos de inhibir la formación de biofilm fue determinada para los cuatro aislados STEC seleccionados (O115, O54, O22 y O74) a la concentración inicial de 10mg/mL. Los porcentajes de inhibición calculados de cada extracto para cada aislado y la actividad inhibitoria de la formación de biofilm de los extractos vegetales clasificada de acuerdo con los criterios que se describieron en el apartado 3.8 del apartado de Materiales y Métodos, se resume en la Tabla 6.

Tabla 6: Actividad inhibitoria de la formación de biofilm en aislados STEC.

Extractos vegetales metanólicos	O115	O74	O54	O22
<i>Aloysia virgata</i> var. <i>Platiphylla</i>	98% (E)	100%(E)	100%(E)	100%(E)
<i>Sidastrum paniculatum</i>	99% (E)	97% (E)	99% (E)	100%(E)
<i>Ocotea diospyrifolia</i>	98%(E)	96%(E)	100%(E)	93%(E)
<i>Hyptis brevipes</i>	99%(E)	65%(B)	35%(SE)	94%(E)
<i>Pterocaulon alopecuroides</i> (Lam.) DC.	-13%(SE)	21%(SE)	-26%(SE)	6%(SE)
<i>Eupatorium ivifolium</i> L.	-6%(SE)	-70%(E)	13%(SE)	-26%(SE)
<i>Aegiphila brachiata</i> Vell.	40%(SE)	-133%(E)	-35%(SE)	-230%(E)
<i>Tessaria dodoneifolia</i> (Hook. & Arn.)	14%(SE)	-126%(E)	-274%(E)	-61%(E)
<i>Hyptis metabilis</i>	68%(B)	-68%(E)	-522%(E)	99%(E)
<i>Croton bonplandianum</i>	43%(SE)	-63%(B)	64%(B)	97%(E)
<i>Pterocaulon angustifolium</i>	68%(B)	-23%(SE)	-6%(SE)	49%(SE)
<i>Acanthospermum australe</i> (Loef.) Kuntze	33%(SE)	16%(SE)	-605%(E)	-153%(E)
<i>Cadiospermum grandiflorum</i> Sw.	7%(SE)	-115%(E)	-72%(E)	-82%(E)
<i>Luehea divaricata</i>	35%(SE)	-283%(E)	-241%(E)	-332%(E)
<i>Allophylus edulis</i>	16%(SE)	56%(B)	-396%(E)	-306%(E)
<i>Aloysia gratissima</i>	83%(E)	-97%(E)	-23%(SE)	100%(E)
<i>Solidago chilensis</i>	-5%(SE)	-415%(E)	41%(SE)	39%(SE)
<i>Serjania minutiflora</i> Radlk.	-3%(SE)	-42%(SE)	-66%(B)	-181%(E)
<i>Genipa americana</i>	-15%(SE)	-645%(E)	-95%(E)	-281%(E)
<i>Centratherum punctatum</i>	-10%(SE)	-1098%(E)	-409%(E)	-429%(E)

Referencia

- E** Excelente actividad inhibitoria de la formación de biofilm (70% a 100%)
- B** Buena actividad inhibitoria de la formación de biofilm (50% a 69%)
- E** Excelente actividad inductora de la formación de biofilm (-70% a -100%)
- B** Buena actividad inductora de la formación de biofilm (-50% a -69%)
- SE** Sin efecto sobre el biofilm (<50% o <-50%)

Se observaron tres extractos con una excelente actividad inhibitoria de la formación de biofilm contra los cuatro aislados STEC en estudio.

El extracto de *Aloysia virgata* var. *Platiphylla* con porcentajes de inhibición de 98% contra el aislado STEC de serogrupo O115 y 100% contra los aislados STEC de serogrupos O74, O54 y O22.

El extracto de *Sidastrum paniculatum* con porcentajes de inhibición de 97% contra el aislado STEC de serogrupo O74, 99% contra los aislados de serogrupos O54 y O115, y el 100% contra el aislado STEC de serogrupo O22.

El extracto de *Ocotea diospyrifolia* con porcentajes de inhibición de 93% contra el aislado STEC de serogrupo O22, 96% para el aislado O74, 98% para el aislado O115 y del 100% para el aislado O54.

El extracto de *Hyptis brevipes* exhibió excelente actividad inhibidora de biofilm contra los aislados STEC O115 y O22 con porcentajes de inhibición de 99% y 94%, respectivamente; sin embargo, para los aislados O74 y O54 el efecto inhibitor no fue tan efectivo, con porcentajes de 65% catalogada como buen inhibidor y 35% correspondiente a sin efecto en el biofilm, según el criterio establecido.

En relación con los extractos *Tessaria dodoneifolia* (Hook. & Arn.) Cabrera, *Cadiospermum grandiflorum* Sw, *Luehea divaricata*, *Genipa americana* y *Centratherum punctatum* presentaron excelente actividad inductora de biofilm en los aislados STEC O74, O54 y O22, pero resultó sin efecto sobre la formación del aislado O115.

El extracto *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC fue el único que resultó sin efecto sobre la formación de biofilm de los 4 aislados en estudio.

Los demás extractos estudiados, no han demostrado una predominancia ya sea del efecto inhibitorio o del efecto inductor en la formación de biofilm, ya que se presentaron resultados muy variables en función a los aislados STEC que fueron expuestos a éstos.

4.5 Determinación del efecto dosis-respuesta de los extractos vegetales sobre la formación de biofilm




Para los extractos *Aloysia virgata* var. *Platiphylla*, *Sidastrum paniculatum* y *Ocotea diospyrifolia* que resultaron inhibidores a la concentración de 10mg/ml de la formación de biofilm en los 4 aislados STEC, fueron probados el efecto dosis respuesta de estos a las concentraciones de 2mg/mL, 1mg/mL, 0,2mg/L y 0,1 mg/mL. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

El extracto *Ocotea diospyrifolia* presentó excelente actividad inhibidora de la formación de biofilm incluso a la menor concentración testada para el aislado de serogrupo O22 y una buena actividad inhibidora de la formación de biofilm a la concentración de 2mg/mL para el aislado O74. Para los aislados O115 y O54 no se observaron efectos inhibidores a concentraciones menores a 10mg/mL.

El extracto *Aloysia virgata* var. *platiphylla* presentó excelente y buena actividad inhibidora de la formación de biofilm incluso a la menor concentración probada en los aislados de serogrupos O22 y O74 respectivamente. Para el serogrupo O115 presentó buena actividad inhibidora hasta la concentración de 2mg/mL. En el aislado O54 sin embargo no se observó algún efecto inhibidor de la formación de biofilm a las concentraciones menores testadas, incluso a la concentración de 0,1 mg/mL se observó una buena actividad inductora en la formación de biofilm.

Respecto al *Sidastrum paniculatum* se observaron resultados similares al extracto *Aloysia virgata*. Se puede observar que los aislados más sensibles a las concentraciones bajas del extracto fueron el O74 y el O22. En los aislados O115 y O22 no se observaron efectos inhibidores ni inductores en la formación de biofilm a las concentraciones inferiores a 10mg/mL (**Tabla 7**).

Tabla 7. Efecto dosis- respuesta de inhibición de la formación de biofilm

	<i>Ocotea diospyrifolia</i> – Lauraceae (Laurel morotí)					
		10mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,1mg/mL
	O115	98% (E)	10% (SE)	7% (SE)	6% (SE)	7% (SE)
	O74	96% (E)	50% (B)	30% (SE)	44% (SE)	40% (SE)
	O54	93% (E)	10% (SE)	9% (SE)	1% (SE)	-12% (SE)
O22	100% (E)	100% (E)	100% (E)	98% (E)	97% (E)	
	<i>Aloysia virgata var. platiphylla</i> - Verbenaceae					
		10mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,1mg/mL
	O115	98% (E)	50% (B)	48% (SE)	42% (SE)	36% (SE)
	O74	100% (E)	92% (E)	71% (E)	69% (B)	68% (B)
	O54	100% (E)	38% (SE)	26% (SE)	-21% (SE)	-57% (B)
O22	100% (E)	76% (E)	74% (E)	72% (E)	71% (E)	
	<i>Sidastrum paniculatum</i> - Malvaceae (Malva hū)					
		10mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,1mg/mL
	O115	99% (E)	33% (SE)	31% (SE)	21% (SE)	20% (SE)
	O74	97% (E)	83% (E)	83% (E)	83% (E)	80% (E)
	O54	100% (E)	24% (SE)	20% (SE)	13% (SE)	3% (SE)
O22	99% (E)	70% (E)	62% (B)	59% (B)	58% (B)	

Referencia

E	Excelente actividad inhibidora de la formación de biofilm (70% a 100%)
B	Buena actividad inhibidora de la formación de biofilm (50% a 69%)
E	Excelente actividad inductora de la formación de biofilm (-70% a -100%)
B	Buena actividad inductora de la formación de biofilm (-50% a -69%)
SE	Sin efecto sobre el biofilm (<50% o <-50%)

4.6 Determinación del efecto de remoción de biofilm por parte de los extractos vegetales

Se determinó la actividad removedora del biofilm de los 20 extractos vegetales metanólicos contra 4 aislados STEC (O115, O54, O22 y O74) a la concentración inicial de 10mg/mL. Los porcentajes de remoción calculados de cada extracto para cada aislado y la actividad removedora de biofilm de los extractos vegetales clasificada de acuerdo con los criterios descritos en el apartado 3.8 del apartado de Materiales y Métodos, se resume en la Tabla 8.

Tabla 8. Actividad removedora de biofilm en aislados STEC.

Extractos vegetales metanólicos	O115	O74	O54	O22
<i>Pterocaulon alopecuroides</i> (Lam.) DC.	66%(B)	66%(B)	87%(E)	74%(E)
<i>Ocotea diospyrifolia</i>	98%(E)	100%(E)	100%(E)	90%(E)
<i>Hyptis brevipes</i>	99%(E)	79%(E)	99%(E)	100%(E)
<i>Hyptis metabilis</i>	97%(E)	100%(E)	100%(E)	100%(E)
<i>Pterocaulon angustifolium</i>	93%(E)	3%(SE)	100%(E)	100%(E)
<i>Acanthospermum australe</i> (Loef.) Kuntze	92%(E)	80%(E)	98%(E)	81%(E)
<i>Serjania minutiflora</i> Radlk.	33%(SE)	8%(SE)	78%(E)	61%(B)
<i>Aloysia virgata</i> var. <i>Platiphylla</i>	60%(B)	100%(E)	100%(E)	100%(E)
<i>Aloysia gratissima</i>	69%(B)	100%(E)	100%(E)	96%(E)
<i>Sidastrum paniculatum</i>	100%(E)	96%(E)	100%(E)	76%(E)
<i>Eupatorium ivifolium</i> L.	95%(E)	-28%(SE)	52%(B)	26%(SE)
<i>Aegiphila brachiata</i> Vell.	33%(SE)	-219%(E)	-116%(E)	-216%(E)
<i>Tessaria dodoneifolia</i> (Hook. & Arn.)	4%(SE)	-394%(E)	-112%(E)	-113%(E)
<i>Croton bonplandianum</i>	96%(E)	-22%(SE)	69%(B)	31%(SE)
<i>Cadiospermum grandiflorum</i> Sw.	41%(SE)	-455%(E)	-60%(B)	-79%(E)
<i>Luehea divaricata</i>	97%(E)	-67%(B)	-52%(B)	-6%(SE)
<i>Allophylus edulis</i>	21%(SE)	100%(E)	-100%(E)	-67%(B)
<i>Centratherum punctatum</i>	17%(SE)	-551%(E)	-141%(E)	-276%(E)
<i>Solidago chilensis</i>	37%(SE)	-421(E)	48%(SE)	-96%(E)
<i>Genipa americana</i>	-22%(SE)	-190%(E)	-9%(SE)	-216%(E)

Referencia

- E** Excelente actividad removedora de biofilm (70% a 100%)
- B** Buena actividad removedora de biofilm (50% a 69%)
- E** Excelente actividad fijadora de biofilm (-70% a -100%)
- B** Buena actividad fijadora de biofilm (-50% a -69%)
- SE** Sin efecto sobre el biofilm (<50% o <-50%)

En líneas generales se observó un efecto removedor de biofilm predominante en 10 de los 20 extractos metanólicos frente a los 4 serogrupos de STEC.

Se observaron ocho extractos con una excelente o buena actividad removedora de biofilm contra los cuatro aislados STEC en estudio, correspondiente a los siguientes: *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC, *Ocotea diospyrifolia*, *Hyptis brevipes*, *Hyptis metabilis*, *Acanthospermum australe* (Loef.) Kuntze, *Aloysia virgata* var. *Platiphylla*, *Aloysia gratissima* y *Sidastrum paniculatum*.

El extracto *Pterocaulon angustifolium* mostró excelente capacidad removedora de biofilm en 3 de los aislados en estudio, sin embargo, no se observó efecto sobre el aislado O74.

Los extractos, *Serjania minutiflora* Radlk, *Eupatorium ivifolium* L., *Croton bonplandianum* presentaron excelente o buena actividad removedora de biofilm en 2 de los 4 aislados en estudio.

En algunos aislados como el *Aegiphila brachiata* Vell, *Tessaria dodoneifolia* (Hook. & Arn.) Cabrera, *Cadiospermum grandiflorum* Sw, *Centratherum punctatum*, *Solidago chilensis* y *Genipa americana* presentaron en su mayoría actividad fijadora de biofilm en los aislados en estudio.

Para los demás extractos como el *Luehea divaricata* y *Allophylus edulis* no se observó una predominancia ya sea del efecto removedor o del efecto fijador en el biofilm, ya que se presentaron resultados muy variables en función a los aislados STEC que fueron expuestos a éstos.

4.7 Determinación del efecto dosis-respuesta en la remoción de biofilm por parte de los extractos vegetales

Para los extractos *Pterocaulam alopecuroides* (Lam.) DC., *Ocotea diospyrifolia*, *Hyptis brevipes*, *Hyptis metabilis*, *Acanthospermum australe* (Loef.) Kuntze, *Aloysia virgata* var. *Platiphylla*, *Aloysia gratissima* y *Sidastrum paniculatum* que resultaron removedores de biofilm a la concentración de 10mg/ml en los 4 aislados STEC, se probó el efecto dosis respuesta de los mismos, a las concentraciones de 2mg/mL, 1mg/mL, 0,2mg/L y 0,1 mg/mL. (Tabla 9).

El extracto metanólico de *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) presentó mayor actividad removedora de biofilm del aislado O22, donde se observa que, a concentraciones de 0,1mg/ml sigue presentando buena actividad. Para los aislados O74, O54 y O22 se observa que la concentración óptima de remoción de biofilm se encuentra entre 2mg/ml y 1mg/mL. Respecto a este extracto el aislado O115 demostró ser más resistente en cuanto a la remoción de su biofilm ya formado, a las concentraciones probadas (Tabla 9).

El extracto de *Sidastrum paniculatum* presentó excelente actividad removerodora de biofilm a todas las concentraciones testadas para el aislados O22, en el cuál además se observa el aumento de la actividad removedora a medida que disminuye la concentración del extracto. En los aislados O115 y O74 no se observaron efectos de remoción de biofilm a concentraciones inferiores a 10mg/ml, pero en el aislado O74, a la concentración de 0,1

mg/ml se observa el efecto de fijación de biofilm con un porcentaje igual a 99% catalogado como excelente fijador (Tabla 9).







Para los extractos del género *Hyptis*, resultaron con el mismo comportamiento respecto al efecto dosis respuesta. Para los 4 aislados, los extractos de *Hyptis brevipes* y *Hyptis mutabilis* no presentaron actividad removedora de biofilm a concentraciones inferiores a 10mg/mL (Tabla 9).


Para el extracto *Acanthospermum australe* se observó actividad removedora de biofilm a la concentración de 2mg/mL solamente en el aislado O74. Para los demás aislados no se observó un efecto de remoción de biofilm a concentraciones inferiores de 10mg/mL. Pero en el aislado O22 se observa el efecto de fijación de biofilm a las concentraciones de 1mg/mL, 0,2mg/mL y 0,1mg/mL del extracto (Tabla 9).


El extracto *Ocotea diospyrifolia* demostró tener excelente actividad removedora de biofilm a la concentración de 2mg/ml sobre el aislado O74, sin embargo, a las concentraciones de 0,2mg/mL y 0,1mg/mL se observó excelente actividad fijadora de biofilm. Para los aislados O115, O54 y O22 no se observaron efecto de remoción o fijación de biofilm a las concentraciones testadas (Tabla 9).

Para los extractos del género *Aloysia* no se observan efecto de remoción de biofilm a las concentraciones inferiores a 10mg/mL para los 4 aislados en estudio. Sin embargo, para el serogrupo O74, bajo el efecto del extracto metanólico de *Aloysia gratissima* se puede observar el resultado de fijación de biofilm a las concentraciones de 2mg/mL, 1mg/mL, 0,2mg/mL y 0,1mg/mL con un comportamiento de aumento del efecto a medida que disminuye la concentración del extracto. El extracto de *Aloysia virgata* presenta el mismo efecto sobre el aislado O74, donde a partir de la concentración de 0,2mg/mL resulta en la fijación de biofilm (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto dosis- respuesta en la remoción de biofilm de STEC

	<i>Pterocaulon alopecuroides</i> (Lam.) - Asteraceae (Toro ka'ā morotī)					
		10mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,1mg/mL
	O115	66% (B)	53% (B)	-5% (SE)	-31% (SE)	-31% (SE)
	O74	66% (B)	100% (E)	100% (E)	-12% (SE)	-26% (SE)
	O54	87% (E)	100% (E)	94% (E)	23% (SE)	24% (SE)
O22	74% (E)	100% (E)	100% (E)	58% (B)	51% (B)	
	<i>Sidastrum paniculatum</i> – Malvaceae (Malva hū)					
		10mg/mL	2mg/mL	1mg/MI	0,2mg/mL	0,1mg/mL
	O115	100% (E)	8% (SE)	-44% (SE)	-19% (SE)	-35% (SE)
	O74	96% (E)	-5% (SE)	-11% (SE)	-25% (SE)	-99% (E)
	O54	100% (E)	61% (B)	23% (SE)	37% (SE)	27% (SE)
O22	76% (E)	88% (E)	89% (E)	92% (E)	93% (E)	
	<i>Hyptis brevipes</i> - Lamiaceae					
		10mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,1mg/MI
	O115	99% (E)	-8% (SE)	-25% (SE)	-26% (SE)	-28% (SE)
	O74	79% (E)	22% (SE)	11% (SE)	-33% (SE)	-42% (SE)
	O54	99% (E)	-15% (SE)	-14% (SE)	3% (SE)	40% (SE)
O22	100% (E)	9% (SE)	15% (SE)	48% (SE)	47% (SE)	
	<i>Hyptis mutabilis</i> - Lamiaceae (Kavara ka'ā)					
		10mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,1mg/mL
	O115	97% (E)	-27% (SE)	-7% (SE)	-17% (SE)	-16% (SE)
	O74	100% (E)	30% (SE)	5% (SE)	-8% (SE)	-49% (SE)
	O54	100% (E)	33% (SE)	12% (SE)	13% (SE)	0% (SE)
O22	100% (E)	20% (SE)	7% (SE)	39% (SE)	35% (SE)	
	<i>Acanthospermum australe</i> (Loef.) Kuntze – Asteraceae					
		10mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,1mg/mL
	O115	92% (E)	-29% (SE)	-38% (SE)	-33% (SE)	-30% (SE)
	O74	80% (E)	59% (B)	3% (SE)	-48% (SE)	-45% (SE)
	O54	98% (E)	4% (SE)	-7% (SE)	-13% (SE)	-28% (SE)
O22	81% (E)	-29% (SE)	-52% (B)	-69% (B)	-53% (B)	
	<i>Ocotea diospyrifolia</i> - Lauraceae (Laurel morotī)					
		10mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,1mg/mL
	O115	98% (E)	36% (SE)	-36% (SE)	-23% (SE)	-21% (SE)
	O74	100% (E)	100% (E)	-40% (SE)	-85% (E)	-84% (E)
	O54	100% (E)	-26% (SE)	-42% (SE)	-19% (SE)	-1% (SE)
O22	90% (E)	-18% (SE)	-19% (SE)	23% (SE)	-16% (SE)	

	<i>Aloysia gratissima</i>– Verbenaceae (Poleo í)				
	10mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,1mg/mL
O115	69% (B)	16% (SE)	30% (SE)	-4% (SE)	-6% (SE)
O74	100% (E)	-98% (E)	-96% (E)	-210% (E)	-238% (E)
O54	100% (E)	20% (SE)	12% (SE)	13% (SE)	-8% (SE)
O22	96% (E)	15% (SE)	13% (SE)	48% (SE)	38% (SE)

	<i>Aloysia virgata var. platiphylla</i>- Verbenaceae				
	10mg/mL	2mg/mL	1mg/mL	0,2mg/mL	0,1mg/mL
O115	60% (B)	-9% (SE)	-48% (SE)	-35% (SE)	-36% (SE)
O74	100% (E)	96% (E)	8% (SE)	-64% (B)	-67% (B)
O54	100% (E)	93% (E)	14% (SE)	13% (SE)	-9% (SE)
O22	100% (E)	39% (SE)	43% (SE)	45% (SE)	48% (SE)

Referencia

E	Excelente actividad removedora de biofilm (70% a 100%)
B	Buena actividad removedora de biofilm (50% a 69%)
E	Excelente actividad fijadora de biofilm (-70% a -100%)
B	Buena actividad fijadora de biofilm (-50% a -69%)
SE	Sin efecto sobre el biofilm (<50% o <-50%)

4.8 Determinación de la huella dactilar cromatográfica de los extractos vegetales con actividad inhibitoria y removedora de biofilm.

Para el análisis del perfil cromatográfico se seleccionaron los extractos metanólicos de *Ocotea diospyrifolia*, *Sidastrum paniculatum* y *Aloysia virgata* que resultaron tanto inhibidores como removedores de biofilm en todos los aislados STEC analizados.

Por medio de la huella dactilar cromatográfica se puede analizar el perfil de los extractos, permitiendo seleccionar los compuestos más prometedores de acuerdo con el interés del trabajo.

La especie *O. diospyrifolia* pertenece a la familia *Lauraceae*, conocida por presentar como marcador taxonómico la presencia de alcaloides. Del análisis del perfil cromatográfico para dicha especie se pudieron observar claramente iones moleculares para tres compuestos, con pesos moleculares correspondientes a 314,3 g/mol, 356,4 g/mol y 340,4 g/mol.

En el análisis de los iones correspondientes se pudo relacionar las masas moleculares de los mismos con algunos compuestos registrados en la literatura. El ion de masa 314,3 g/mol correspondería a la estructura de un alcaloide denominado Norisoboldina, el de 340,4 g/mol coincide con la masa molecular del alcaloide aporfínico Dicentrina y el de 356,4 g/mol con el alcaloide aporfínico Glaucina o también conocido como Leucoxina.

En la Figura 9 se muestran los cromatogramas correspondientes a los picos de los iones mencionados para el extracto metanólico obtenido de *O. diospyrifolia*.

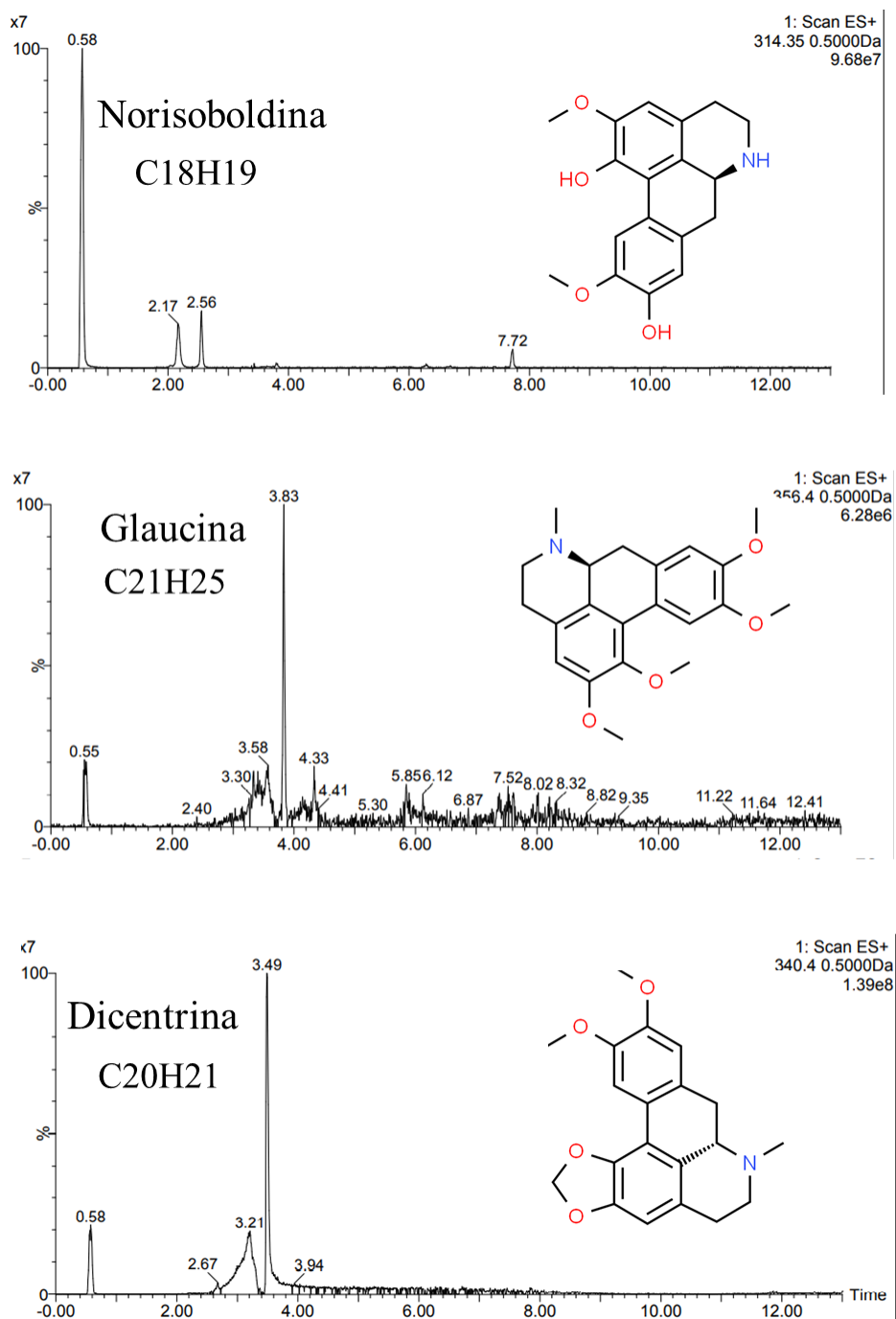


Figura 9. Cromatogramas correspondientes a los compuestos identificados para el extracto de *Ocotea diospyrifolia* obtenidos por LC-DAD-MS. Las estructuras corresponden al pico principal.

Para la especie *S. paniculatum*, perteneciente a la familia *Malvaceae*, se pudieron asignar tres iones moleculares de masas correspondientes a 295,4 g/mol, 311,2 g/mol y 314,3 g/mol (Figura 10).

Del análisis de los mismos con la literatura revisada, se sugiere que el compuesto de 295,4 g/mol de masa molecular corresponde al ácido *p*-coutárico, el de 311,2 g/mol al ácido caftárico o caffeoil tartárico y el de 314,3g/mol al compuesto Moupinamida. En los dos primeros casos se han obtenidos varios picos con la misma masa, que corresponderían probablemente a isómeros.

En la Figura 10 se muestran los cromatogramas correspondientes a los iones analizados para el extracto metanólico obtenido de *S. paniculatum*.

La especie *A. virgata* pertenece a la familia *Verbenaceae*. Del análisis del perfil cromatográfico para dicha especie se pudieron asignar dos iones moleculares, con pesos correspondientes a 363,0 g/mol y 192,9 g/mol.

En el análisis de dichos iones se pudo relacionar las masas moleculares de los mismos con algunos compuestos registrados en la literatura. El ion de masa 363,0 g/mol correspondiente a la estructura de Hoffmaniactona-17-O-acetato y el de 192,9 g/mol con el Ácido ferúlico.

En la Figura 11 se muestran los cromatogramas correspondientes a los iones identificados para el extracto metanólico obtenido de *A. virgata*.

Como ya se ha mencionado más arriba, en los cromatogramas correspondientes a los metabolitos analizados también se observan picos adicionales de la misma masa molecular con diferentes tiempos de retención que corresponden posiblemente a isómeros de dichos compuestos.

Debe resaltarse que la identificación debe ser confirmada por estudios posteriores de fragmentación de los iones moleculares (MS/MS) así como por otras técnicas espectroscópicas que no se disponen aún en el país como RMN.

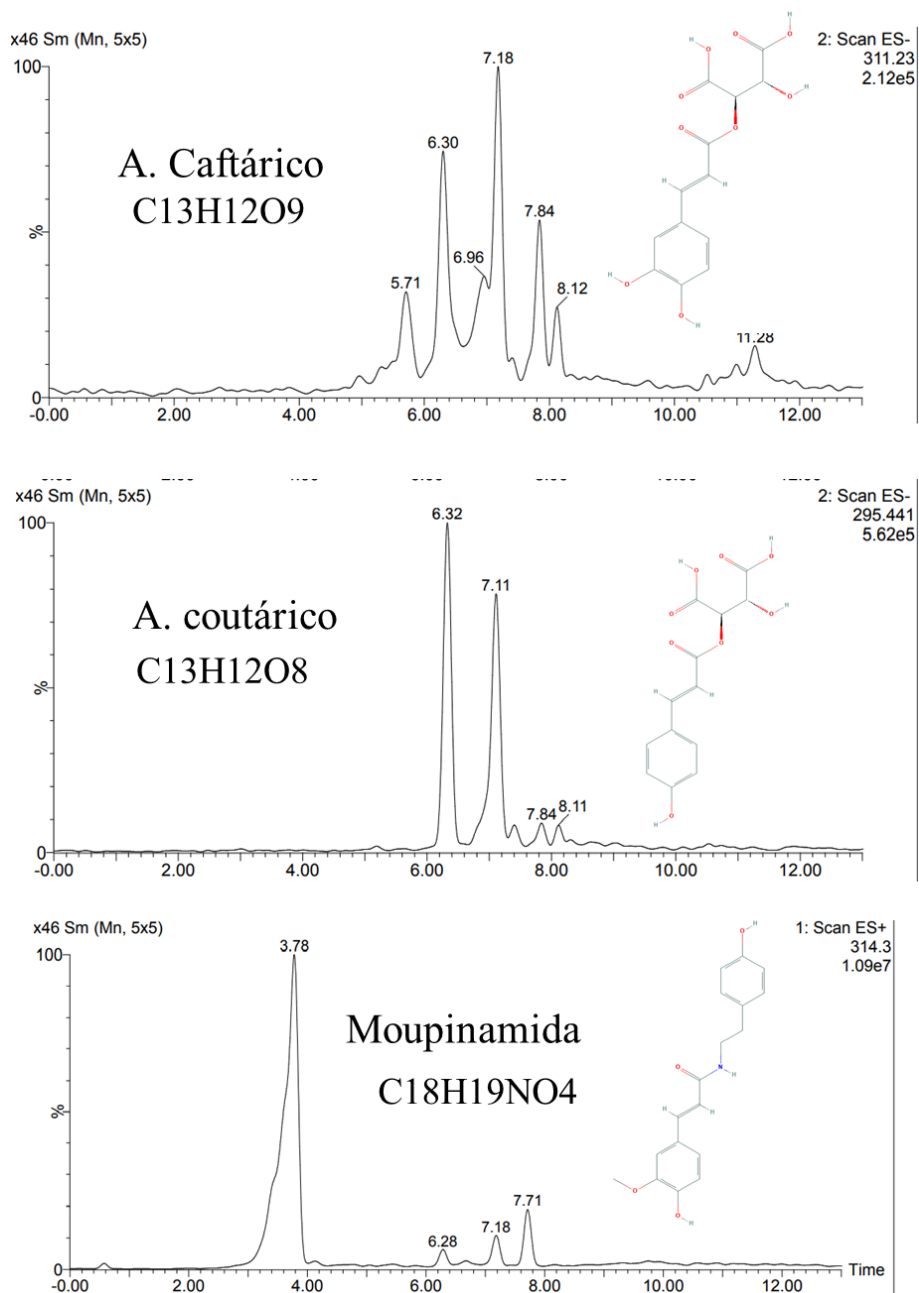


Figura 10. Cromatogramas correspondientes a los compuestos identificados para el extracto de *Sidastrum paniculatum*. Perfiles obtenidos por LC-DAD-MS. En los dos primeros casos hay más de un isómero.

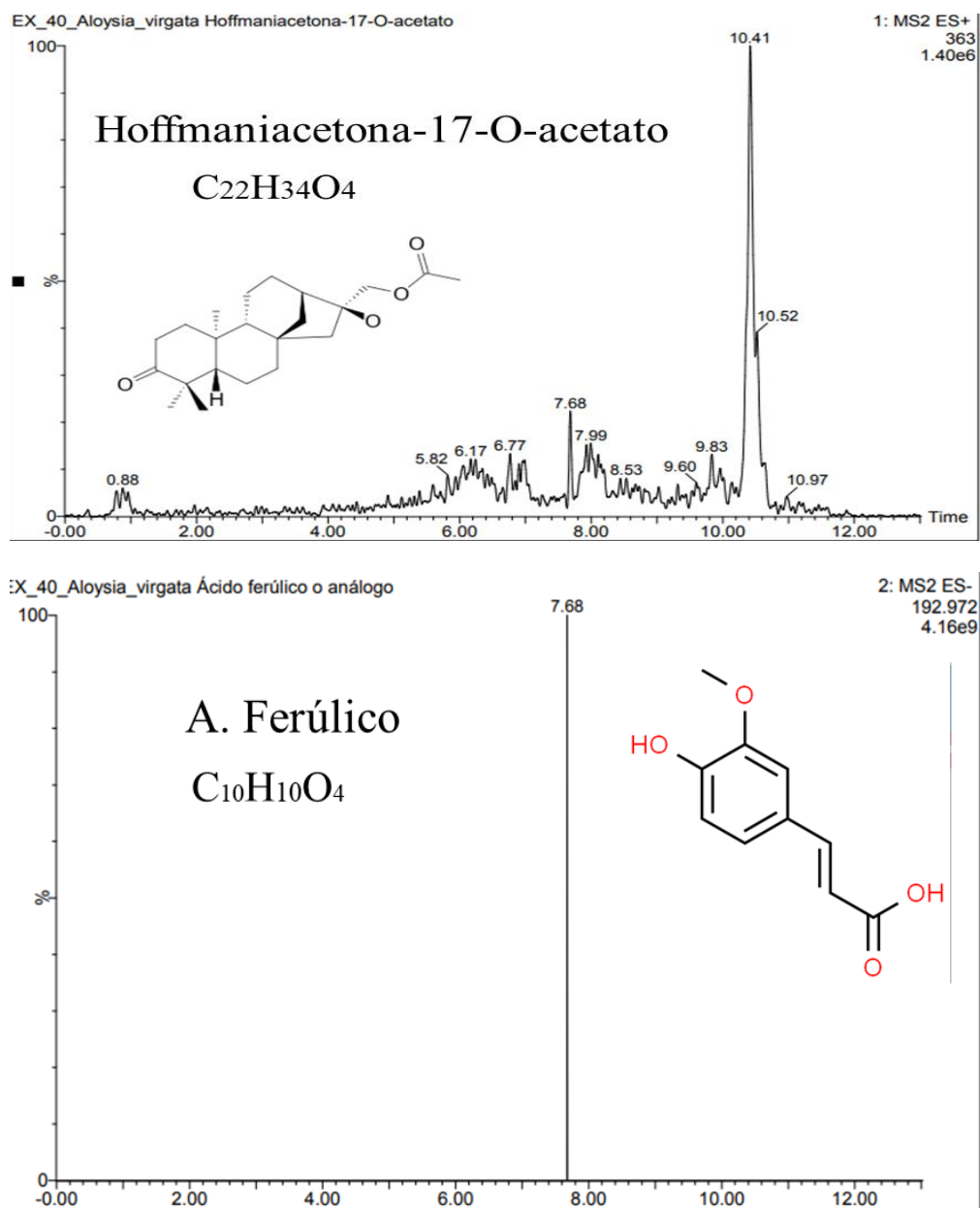


Figura 11. Cromatogramas correspondientes a los picos analizados para el extracto de *Aloysia virgata*. Perfiles obtenidos por LC-DAD-MS. Las estructuras corresponden al pico principal.

5. DISCUSIÓN

5.1 Detección de genes asociados a la formación de biofilm

El gen *flu* fue detectado en tres de los 4 aislados STEC en estudio, en los serotipos O54, O74, O22. Este gen ha sido identificado y caracterizado previamente por Henderson y col. 1997 en cepas STEC de referencia, donde observaron que es el principal responsable de la autoagregación celular, el gen *flu*, codifica la proteína Agn43 que se encuentra muy extendida entre las cepas *E. coli* patógena. Se ha demostrado recientemente que esta proteína además se sintetiza durante casos de enfermedad humana, lo que sugiere que desempeña un papel importante en el desarrollo de SUH (49).

En este estudio los 4 aislados STEC de serotipos O115, O54, O22 y O74, resultaron ser portadores del gen *csgA*. Según Biscola y col. 2011 la producción de Curli no sólo varía según el serotipo, sino dentro de un mismo serotipo, siendo así la producción de esta influenciada por varios factores ambientales, como temperatura, medios nutritivos, material de las superficies, entre otras (29).

La producción de Curli puede no ser un factor indispensable en la capacidad de una cepa para formar biofilm, sin embargo, en varios estudios, se sugieren como uno de varios factores contribuyentes (64), por ejemplo, se ha visto que, en superficies como poliestireno y otras superficies hidrofóbicas, la proteína Curli resultó tener más protagonismo en la adherencia (63).

Respecto a la portación del gen *fimH* se observó que los 4 aislados STEC en estudio resultaron ser portadores de dicho gen, dato interesante ya que además de favorecer el alto potencial de formar biofilm, se encuentra relacionado con el potencial patogénico, ya que datos recientes indican que el *fimH* activa directamente cascadas de señalización que conducen a la internalización bacteriana (57). Las proteínas fimbrias tipo 1 también se encuentran altamente implicadas en el establecimiento de biofilm en superficies abióticas(109). En estudios previos se han descrito alta frecuencia de portación y expresión del gen *fimH* por la mayoría de las cepas STEC no-O157, curiosamente se ha visto que las cepas O157 carecen de la capacidad de expresar fimbrias tipo 1 (109), lo que sugiere que en las cepas STEC O157, el gen *fimH* no participa en la formación de biopelículas.

La portación simultánea de algunos genes codificantes de estructuras importantes en el biofilm de STEC, como los genes descritos en este estudio, son esenciales para la unión estable del biofilm a la superficie, la maduración y la autoagregación entre las células STEC (45). Algunos autores han encontrado correlación positiva entre la formación de biofilm con la presencia de fimbrias tipo 1, Curli, Agn43 en aislados de *E. coli* (45,52,54,110).

Las diferencias entre la portación de ciertos genes relacionados con el biofilm y la expresión del fenotipo fuerte formador de biofilm se relaciona principalmente al *background* genético de los aislados STEC, como lo evidencian los datos de Cáceres y col en el año 2019, además del rol de las condiciones ambientales (111).

En el ámbito de la industria cárnica, el biofilm bacteriano adherido a los equipos de manipulación alimentaria, pueden presentar una mayor resistencia a los desinfectantes y convertirse en fuentes de contaminación cruzada durante el procesamiento de los alimentos (65).

Los estudios sobre la formación de biofilm en STEC están relacionados principalmente con el serotipo O157:H7 que es el principal serotipo STEC implicado en casos esporádicos y brotes de Colitis Hemorrágica y SUH en todo el mundo (18). Sin embargo, se han reportado otros serotipos que se aíslan con frecuencia de enfermedades graves o infecciones por STEC en humanos, también llamados como STEC no-O157 (112).

En Paraguay, según reportes de Rojas y col. 2016 (76), se observó que el 100% de los 11 establecimientos en estudio poseían bovinos portadores de STEC, sin embargo, no fue detectado la presencia de STEC del serogrupo O157. Otros estudios anteriores enfocados en portación en bovinos en Paraguay tampoco han detectado aislados O157, mostrando un predominio de aislamientos no-O157 y debido a este hecho nos hemos centrado en el análisis de 4 aislados STEC no-O157 representativos, aislados de ganados bovinos paraguayos, incluidos los serogrupos O115, O54, O22 y O74 caracterizado en un estudio previo como fuertes formadores de biofilm (104).

La portación de los genes en los aislados STEC en estudio señala posibles mecanismos de formación de biofilm. Por tanto, sienta bases importantes para plantear estudios a futuro que permitan analizar factores importantes como los patrones de expresión

de estos genes en condiciones de formación de biofilm, así mismo no deja de ser importante poder analizar otros aislamientos STEC provenientes de ganado bovino, o incluso proveniente de otras fuentes que nos permitan ahondar la comprensión de este fenómeno complejo y con tanta importancia desde el punto de vista sanitario y económico.

5.2 Determinación de concentración inhibitoria mínima

La determinación de la CIM fue realizada para hallar las concentraciones de los extractos a emplear en los ensayos de inhibición de formación y de remoción de biofilm de STEC. Es importante resaltar que para 7 extractos de 20, los resultados obtenidos aportan los primeros datos de su tipo, como lo son las especies de *Pterocaulon alopecuroides*, *Ocotea diospyrifolia*, *Eupatorium ivifolium*, *Aegiphila brachiata*, *Tessaria dodoneifolia*, *Serjania minutiflora* y *Sidastrum paniculatum*.

Para los demás extractos vegetales en estudio, a pesar de hallarse datos reportados de CIM sobre cepas de *E. coli*, los resultados obtenidos en este trabajo representan los primeros de su tipo sobre cepas STEC de serogrupos O115, O54, O22 y O74 aislados de ganado bovino paraguayo, en especies como *Hyptis brevipes*, *Hyptis mutabilis*, *Croton bonplandianum*, *Pterocaulon angustifolium*, *Acanthospermum australe*, *Cardiospermum grandiflorum*, *Allophylus edulis*, *Genipa americana*, *Solidago chilensis*, *Luehea divaricata*, *Aloysia virgata*, *Aloysia gratissima* y *Centratherum punctatum*.

Los valores de CIM determinados en este estudio presentaron rangos variables de 20mg/mL a mayor de 40mg/mL, en respuesta al tipo de extracto y al tipo de aislado al que se estudió. Varios autores describen que los extractos con CIM inferiores o iguales a 0,25 mg/mL son considerados como extractos con elevada actividad antimicrobiana, en tanto que los extractos con CIM superior a 2 mg/mL son considerados como inactivos en lo referente a actividad antimicrobiana (113).

Los 20 extractos estudiados no presentaron actividad antimicrobiana frente a los 4 serotipos STEC, por presentar valores de CIM superiores a 2mg/mL. Algunos autores consideran dicho resultado como favorable respecto a la búsqueda de un agente antibiofilm potencial, ya que de esta manera se disminuiría la posibilidad de generar resistencia

antimicrobiana frente a los compuestos de los extractos, además de disminuir el riesgo de actividad biocida frente a las bacterias benéficas (114,115).

La variabilidad de las CIM entre los extractos vegetales puede deberse principalmente a la variación de sus constituyentes químicos, lo que determina los compuestos con actividad antimicrobiana que puedan estar presentes. Además, existen de otras variables como el tipo de solvente, métodos de extracción empleados, estación o periodo de recolección de las plantas, entre otras condiciones que influyen en la composición del extracto de una planta, pudiendo presentarse diferencias en las actividades observadas para una misma planta en función a los distintos compuestos extraídos según la metodología empleada (81).

Las variaciones que se observan de la CIM para cada extracto también se encuentran sujeta al tipo de aislado STEC, ya que está asociada a la variabilidad genética presente entre los diferentes serotipos, lo cual afecta la susceptibilidad de los aislados a los diversos agentes antimicrobianos que se encuentran presentes en los extractos por medio de diferentes mecanismos (45). Estas variaciones se asocian a la gran variabilidad de los mecanismos de acción o procesos involucrados en la actividad de los extractos vegetales, que incluyen la regulación de expresión de proteínas de la membrana celular, bombas de eflujo, regulación en la expresión de factores de virulencia, como en la tasa de crecimiento diferencial de los distintos aislados (116–118).

Por otra parte, algunos autores describen actividad antimicrobiana de varios de los extractos estudiados contra otras especies bacterianas Gram positivas, cuya actividad diferencial puede estar relacionado a mecanismos de acción en donde se involucre a la pared bacteriana como blanco (100,119), por ejemplo, para el género *Eupatorium* se describe actividad antimicrobiana contra Gram positivos como *Staphylococcus aureus*, pero no contra Gram negativos (89).

En el caso del género *Hyptis* se ha descrito una excelente actividad antimicrobiana de *H. suaveolens* contra patógenos como *E. coli*, *S. aureus* y *Aspergillus Niger*. (Mozhiyarasi y col. 2016). Así también se ha descrito para el aceite esencial de *H. brevipes*, una elevada actividad contra Gram negativos como *E. coli*, con CIM del orden de 3 µg/mL, a diferencia de nuestro estudio donde se obtuvo una CIM mucho más elevada para el extracto metanólico

de esta planta frente a los 4 aislados STEC en estudio (120). Sin embargo, para el aceite esencial de *H. mutabilis* se ha descrito ser inactivo contra Gram negativos como *E. coli* ATCC, *Klebsiella spp.* o *Pseudomonas aeruginosa* (93).

Para el extracto metanólico de *C. bonplandianum*, un grupo de investigación demostró en el año 2015, que éste posee actividad antimicrobiana contra *E. coli* a diferencia con los hallazgos presentados en este estudio (94).

En cuanto a *C. grandiflorum*, se ha reportado una CIM que oscilaba entre 35 a 50 mg/mL del extracto metanólico de esta planta contra *E. coli*, este dato es congruente con los resultados obtenido en este estudio (121).

Se ha reportado que tanto el extracto acuoso como el extracto etanólico de *A. edulis* son inactivos contra *E. coli* y frente a especies bacterianas Gram positivas, datos también congruentes con lo obtenido en este estudio (122).

En un estudio realizado en 2006 sobre el extracto de las frutas de *G. americana* se observó que presentaba actividad antimicrobiana contra *E. coli*, sin embargo, el extracto de las hojas de esta planta resultó ser inactivo para la misma, tal y como se reporta en el presente estudio donde también fue utilizada la hoja de la planta para obtener el extracto metanólico. (98,123).

En un estudio realizado en el 2009, se observó actividad antimicrobiana importante contra *E.coli* y otras especies bacterianas del extracto acuoso del *S. chilensis*. La diferencia de actividad antimicrobiana con los resultados de este estudio probablemente se deba al solvente de extracción, donde los principales compuestos que manifiestan dicha actividad se favorecen con la extracción acuosa que con la metanólica (101).

Sobre extractos metanólicos del género *Tessaria*, se ha reportado actividad contra bacterias Gram positivas, pero no así para Gram negativas como *E. coli*, en congruencia con lo observado en este estudio, a pesar de no tratarse de la misma especie de este género (92).

Fueron realizados estudios sobre extractos con diferentes solventes de *A. australe* y *L. divaricata*, en ambas investigaciones ninguno resulto ser activo frente a las bacterias Gram negativas ensayadas, entre ellas *E. coli* (124).

Por último, en lo que respecta al género *Aloysia*, existen varios trabajos sobre la actividad antimicrobiana y antifúngica de sus aceites esenciales, donde se reportan buena actividad frente el género *E.coli* y otras especies bacterianas y fúngicas (99,125). Sin embargo, estos resultados difieren a los descritos en nuestro estudio, pudiendo deberse a las diferencias en los métodos y solventes de extracción empleados, así como también de las partes de las plantas empleadas.

5.3 Determinación del efecto inhibitorio de la formación de biofilm y la actividad removedora de los extractos vegetales sobre el biofilm

La inhibición o remoción de biofilm por extractos de plantas, se puede dar mediante la acción de diversos compuestos y metabolitos secundarios que contienen los extractos vegetales en distintas proporciones. Los mecanismos por los cuales estos compuestos pueden actuar para inhibir o remover el biofilm a nivel de la adhesión celular bacteriana son extremadamente diversos, ya sea de manera independiente, o bien por el efecto sinérgico entre los compuestos presentes en los extractos (107).

a) Extractos vegetales con excelente actividad inhibidora y removedora de biofilm

Los extractos metanólicos de *Sidastrum paniculatum*, *Aloysia virgata* y *Ocotea diospyrifolia* se destacan entre los 20 extractos empleados en este estudio, por presentar tanto excelente actividad inhibidora de la formación de biofilm, como excelente actividad removedora de biofilm frente a los 4 aislados STEC analizados a la concentración de 10mg/mL.

En el caso de *Sidastrum paniculatum*, un arbusto perteneciente a la familia *Malvaceae*, se distribuye desde México hasta Argentina. En Paraguay es conocida como “*Malva hũ*” y se emplea popularmente como digestivo, antidiarreico y contra afecciones ováricas (126). Estudios llevados a cabo en Brasil revelan que los principales constituyentes del extracto etanólico de las partes aéreas de esta planta son los triterpenos, aislándose

también compuestos fenólicos y esteroides a partir del extracto etanólico de la planta entera (83,102,127), pero hasta la fecha, no se hallaron referencias respecto a la actividad inhibitoria o removedora de biofilm de los extractos de *S. paniculatum*, para ninguna especie bacteriana, por lo que los datos reportados en este estudio serían los primeros de su tipo.

Por otra parte algunos ácidos orgánicos de estructuras químicas similares a los reportados para el género *Sidastrum*, inhiben bombas de eflujo en cepas de *E. coli* que sobreexpresan estas proteínas y por tanto presentan capacidad de inhibir la formación de biofilm a concentraciones sub-inhedorias, similar a lo observado en este estudio (114,128).

La actividad removedora del *S. paniculatum* puede estar influenciada por el mecanismo de dispersión activa de biofilm, que conduce a la producción de enzimas que degradan la matriz exopolisacárida o por dispersión pasiva que se refiere a los desencadenantes nutritivos o ambientales que liberan directamente las células bacterianas del biofilm (129).

Por su parte el extracto de *Aloysia virgata*, también conocida como almendra dulce, es una planta perenne perteneciente a la familia *Verbenacea* nativa de Argentina. En Paraguay se le da el uso popular de expectorante y antireumático (126). En la literatura se la describe con actividad antimicrobiana frente a *E.coli* y otros géneros (130), sin embargo su actividad antibiofilm aun no fue descrita, por lo cual los resultados de este estudio son los primeros.

Vandresen y col (2010) estudiaron los compuestos fitoquímicos del extracto de dicha planta y observaron la presencia de triterpenos, flavonoides glicosídicos y feniletanoides. La posible presencia de dichos metabolitos en el extracto metanólico de *A. virgata* utilizado para este estudio, pueden justificar las actividades antibiofilm observadas, ya que existen publicaciones que reportan la actividad antibiofilm de estos compuestos (114,127,130).

Por ejemplo, los flavonoides, que son metabolitos secundarios polifenólicos, son capaces de actuar sobre las proteínas de superficies bacterianas que participan de la adhesión de éstas a la superficie o la adhesión intercelular. Otros, como los terpenos, que actúan inhibiendo bombas de eflujo y modificando la integridad celular, impidiendo así procesos de transporte como de adhesión celular (114,127). Además, se encuentra la regulación en la

expresión de genes críticos involucrados en la formación del biofilm por ciertos compuestos bioactivos, presentando actividad sobre el sistema *quorum sensing* bacteriano, inhibiendo así las expresiones fenotípicas dependientes de dicho sistema. (131–134).

La planta de *Ocotea diospyrifolia*, perteneciente a la familia *Lauraceae*, es nativa de Brasil y se la ha estudiado ampliamente por sus actividades biológicas comprobadas, destacando su actividad antioxidante, antiinflamatoria, insecticida, antibacteriana y antifúngica, entre otras. En Paraguay se la conoce como *laurel morotí* y su uso popular es de diurético y antiflatulento (126). A pesar de que su actividad antibiofilm no fue descrita hasta la fecha, se han analizado los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Ocotea diospyrifolia*, detectándose la presencia de esteroides y alcaloides, lo que puede justificar el potencial antibiofilm encontrado en el presente estudio (88).

Los extractos metanólicos de *Hyptis brevipes*, *Hyptis mutabilis* y *Aloysia gratissima* presentaron excelente actividad inhibidora y removedora de biofilm para los aislados O115 y O22, y buena actividad o sin efecto inhibitorio para los aislados O74 y O54. La variabilidad en el efecto antibiofilm evidenciado entre los distintos aislados puede deberse a la variabilidad genética presente entre cada serogrupo, que puede influir en la susceptibilidad de cada aislado a los compuestos presentes en un mismo extracto. Además, los mecanismos responsables de la inhibición y remoción de biofilm por estos extractos no se conocen con certeza, y por lo tanto, pueden afectar de manera distinta a diversos niveles del biofilm de los aislados STEC analizados (90,93,99). Sin embargo, se han descrito para el género *Hyptis* compuestos activos como el limoneno, espatulenol y cariofileno, terpenos descritos con actividad antibiofilm (135).

b) Extractos vegetales que presentaron solo actividad removedora de biofilm

Los extractos metanólicos de *Pterocaulon alopecuroides* y *Acanthospermum australe* presentaron excelente actividad removedora de biofilm en los 4 aislados STEC analizados a la concentración de 10mg/mL. El *Pterocaulon angustifolium* presentó excelente actividad removedora en los aislados O115, O54 y O22 en estudio y sin efecto para el aislado O74.

P. alopecuroides es una hierba perenne, perteneciente a la familia *Asteraceae*, se distribuye por todo Sudamérica y el Caribe. En Paraguay es conocida con el nombre de “Toro

ka'a morofĩ” y es empleada popularmente como purificador de la sangre y como tranquilizante (126). Los principales componentes del extracto de la parte aérea de esta planta reportados en la literatura son los flavonoides y cumarinas (136,137).

P. angustifolium es una hierba perenne, perteneciente a la familia *Asteraceae*, se distribuye por Sudamérica, principalmente el Nordeste de Argentina, Paraguay, Uruguay y Brasil. En Paraguay es conocida con el nombre de “Toro ka'a” y se emplea popularmente para el tratamiento del acné, para limpiar heridas, contra las picaduras de mosquitos y en el tratamiento de la artritis (126). Al igual que las demás especies del género *Pterocaulon*, los principales constituyentes de los extractos de esta planta son las cumarinas (95,138).

Los compuestos cumarínicos son capaces de inhibir el biofilm de diversos patógenos humanos, interfiriendo con los sistemas de *quorum sensing* de las bacterias. Siendo este grupo de compuestos los hallados en mayor proporción en las plantas de este género, los mismos podrían ser responsables de la inhibición de la formación de biofilm evidenciada en este estudio (139,140).

Hasta la fecha no se hallaron referencias respecto a la actividad antibiofilm de ninguno de los extractos de las especies del género *Pterocaulon* empleados en este estudio, ni de ninguna otra especie de este género, por lo que los datos reportados en este estudio serían los primeros de su tipo.

Acanthospermum australe, conocida en Paraguay como “Tapekue”, es una planta empleada en la medicina popular para tratar afecciones de la piel y para la curación de heridas (126). Por lo tanto, los datos obtenidos en este trabajo podrían servir de argumento para su uso popular ya que podría evitar la persistencia del biofilm de bacterias como *E.coli* en entornos de las heridas, sin embargo, se necesitan estudios complementarios que aseguren el efecto antibiofilm en la superficie de la piel y también sobre otras especies bacterianas.

Una de las teorías que podría explicar el efecto removedor de los extractos está sujeto a la actividad de dispersión activa o pasiva por parte de los metabolitos o grupos de ellos. Ya que la dispersión activa del biofilm es inducida por un cambio ambiental, que pueden ser el aumento repentino o disminución de la concentración de carbono en el medio, la variación de pH del medio y el aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (141).

Por ejemplo, las células que se dispersan del biofilm espontáneamente se desencadenan por la falta de oxígeno y nutrientes en el centro del biofilm, por medio de la matriz, que sirve como barrera de difusión (142). Sin embargo, la dispersión pasiva está basado en desencadenantes que permiten la liberación directa de las células del biofilm, por medio de activación de la expresión de genes implicados en la motilidad bacteriana, como también genes implicados en la degradación de la matriz extracelular (142).

c) **Extractos vegetales que presentaron actividad inductora y fijadora de biofilm.**

Algunos extractos metanólicos presentaron efectos inductores o fijadores de biofilm con uno o más de dos aislados STEC, en concordancia con lo reportado por Famuyide y colaboradores, quienes describen porcentajes de inhibición de la formación de biofilm con valores negativos, que se corresponden a un efecto inductor o fijador de acuerdo con el tipo ensayo (107).

Uno de los extractos que presentó excelente actividad fijadora como inductora de biofilm en 3 de los 4 aislados STEC fue el *Centratherum punctatum* conocida en Paraguay como “Typycha botõ”, una planta de uso popular para tratar afecciones de la piel, como para curación de heridas (126). Por lo tanto, puede contribuir al efecto indeseado de aumentar la persistencia de bacterias como biofilm, posibilitando el desarrollo de infecciones crónicas y severas.

A pesar de que el efecto inductor o fijador de biofilm sea indeseable o genere complicaciones en las industrias de alimentos y el ámbito clínico, posee potenciales aplicaciones para las especies bacterianas que son utilizadas como bioremediadores, en ingeniería ambiental, ya que el aumento de la biomasa y las características inherentes a los biofilm pueden ser aprovechadas. Por ejemplo, el *Micrococcus denitrificans* y *Bacillus* utilizados para el tratamiento de aguas residuales o ecosistemas que sufren de eutrofización y para la eliminación de hidrocarburos en suelos contaminados utilizando bacterias capaces de degradarlos, respectivamente (143,144).

Los resultados obtenidos con los extractos inductores o fijadores son prometedores desde el punto de vista industrial, medioambiental y su uso biotecnológico. Generan un

amplio horizonte de perspectivas experimentales con objeto de evaluar el efecto de estos con las especies bacterianas de interés.

d) Efecto dosis-respuesta en la actividad inhibidora y removedora de biofilm.

De los extractos que resultaron con excelente actividad inhibidora de la formación de biofilm frente a los 4 aislados STEC, el extracto de *A. virgata* fue el más activo ya que en comparación del efecto, presentó actividad inhibidora incluso a menores concentraciones en 3 de los aislados STEC, a diferencia de otros estudios donde observa la disminución o ausencia de la actividad a menores concentraciones (145). Siguiendo en orden decreciente el extracto de *S. paniculatum* que presentó actividad incluso a concentraciones de 0,1mg/mL frente a dos de los aislados y por último *O. diospyrifolia* que presentó excelente actividad dosis independiente solo para el aislado O22. La concentración efectiva de la actividad evaluada es dependiente del efecto buscado, como también del patógeno empleado.

En cuanto al efecto dosis-respuesta en la remoción de biofilm, el *P. alopecuroides* mostró actividad a diferentes concentraciones en los serogrupos de STEC analizados y el *S. paniculatum* presentó actividad a menores dosis principalmente sobre el serogrupo O22.

Para los demás extractos analizados prácticamente no se observó actividad removedora a menores dosis de 10mg/mL, incluso en algunos casos se observó que a menores concentraciones se veía favorecido el efecto fijador de biofilm. A diluciones bajas el efecto de los extractos puede variar, debido a que se favorecen acciones de algunos compuestos respecto a otros. Es importante mencionar que no siempre el compuesto mayoritario del extracto es el que presenta acción inhibidora o removedora, ya que este efecto podría deberse a la acción conjunta de varios metabolitos que posee el extracto, incluso el efecto podría potenciarse a la proporción correcta (143).

e) Variabilidad del efecto antibiofilm sobre los aislados STEC estudiados

Fue notable que el aislado STEC de serogrupo O22 resultó el más sensible en cuanto a la actividad inhibidora de biofilm de los extractos vegetales de *O. diospyrifolia*, *A. virgata* y *S. paniculatum* y en cuanto a la actividad removedora de biofilm de los extractos *P.*

alopecuroides y *S. paniculatum*, ya que incluso a la concentración más baja testada se observó el efecto inhibitor y removedor respectivamente.

E. coli O22 es un serogrupo cuya frecuencia como causante de enfermedades humanas es relativamente bajo, sin embargo, el aislado STEC O22 analizado en este estudio, porta importantes genes de virulencia, lo que representa una potencial amenaza para la salud pública del país ya que la misma fue aislada de ganado bovino paraguayo.

No obstante, en un estudio realizado por Martorelli y col (2017) se demostró que el serogrupo O22 es capaz de interferir sobre la colonización y adherencia en forma de biofilm de la *E. coli* O157:H7 en ganado bovino, favorecida por su mayor tasa de crecimiento y mayor capacidad de adherencia (146). Este fenómeno podría favorecer que el ganado bovino sea menos susceptible a la colonización del serotipo O157:H7, como también al desprendimiento de dicha bacteria al medio ambiente.

Para los serogrupos O115, O74 y O54 no se han reportado hasta la fecha estudios de la capacidad de formación de biofilm, sin embargo, ya se las ha descrito como causante de importantes brotes de intoxicación alimentaria masiva a nivel mundial (147,148). La portación de factores de virulencia y la capacidad de formar biofilm por parte de los aislados STEC de dichos serogrupos, resaltan la importancia de los hallazgos de nuestro estudio, ya que el biofilm formado por estos aislados resultaron ser sensibles a una gran cantidad de extractos, hecho que merece ser abarcado con más profundidad en futuras investigaciones.

La variabilidad en el efecto antibiofilm evidenciado entre los distintos aislados STEC puede deberse a la variabilidad genética presente entre ellos, como también la susceptibilidad de cada aislado a los compuestos presentes en un mismo extracto. Los mecanismos responsables de la inhibición como remoción de biofilm por estos extractos no se conocen con certeza, y por lo tanto, pueden afectar de manera distinta a diversos niveles en cada paso del proceso del biofilm de los aislados (45).

5.4 Perfil cromatográfico de los extractos de *O. diospyrifolia*, *S. paniculatum* y *Aloysia virgata*

La huella dactilar cromatográfica nos permitió la separación de los compuestos que integraban los extractos de *O. diospyrifolia*, *S. paniculatum* y *A. virgata*, y relacionar los posibles metabolitos con la actividad antibiofilm observada para dichos extractos.

Respecto al extracto de *O. diospyrifolia* el análisis realizado muestra como compuestos principales los alcaloides aporfínicos dicentrina, glaucina y norisoboldine, sin embargo, en los cromatogramas también fueron detectados varios isómeros de la misma masa molecular, por lo tanto, la actividad antibiofilm registrada de este extracto puede deberse al efecto de los alcaloides identificados o sus isómeros. La presencia de alcaloides en el género *Ocotea* es descrito frecuentemente, de las cuales las aporfínicas son las estructuras químicas más abundantes, ya que son encontrados en un número considerable de especies (88).

Algunos de los alcaloides aporfínicos detectados en la especie *O. diospyrifolia* de este trabajo, como la dicentrina, fue reportada recientemente en la especie *Ocotea puberulan*, demostrando actividad antiparasitaria de dicho alcaloide (149).

Existen además, otros estudios que describen la actividad antimicrobiana de los alcaloides aporfínicos (150), mientras que la actividad antibiofilm de dichos compuestos aun no fueron descritos, por lo cual una perspectiva de este trabajo sería evaluar la actividad antibiofilm de la fracción o metabolito aislado del extracto con miras a dilucidar los posibles mecanismos de acción, ya que los alcaloides son conocidos por presentar actividad biológica pronunciada (151). Es importante mencionar que la concentración de estos compuestos puede variar entre diferentes extractos de la misma planta, por tanto, está sujeto a variaciones en el efecto de la actividad observada.

La huella dactilar cromatográfica del *S. paniculatum* sugiere que los iones moleculares detectados corresponden a los compuestos de moupinamida, ácido coutárico y ácido caftárico. Así como lo observado en el cromatograma del extracto de *O. diospyrifolia*, se vieron más de un pico con la misma masa molecular correspondientes a isómeros de los compuestos identificados, con lo cual se resalta que la acción antibiofilm puede estar sujeta no solo a los compuestos citados, sino también a sus isómeros.

En Brasil (2015) se realizó un estudio de *S. paniculatum*, donde se describió metabolitos similares estructuralmente a lo encontrado en este estudio, y que presentaron actividad antiparasitaria (152).

Si bien no existen estudios de los mecanismos de acción antibiofilm de los compuestos específicos identificados para el *S. paniculatum*, se conoce que los ácidos orgánicos presentan actividad antibiofilm por mecanismos relacionados a la interrupción de la superficie celular bacteriana, inhibiendo síntesis de adhesinas relacionadas a la formación de biofilm, aumentando la permeabilidad celular y actuando sobre la bomba de eflujo bacteriano, por lo cual puede pensarse que uno de estos mecanismos pueda estar implicado en la regulación del biofilm del extracto analizado en este estudio, sin embargo, deben realizarse los respectivos experimentos a profundidad para dilucidar el mecanismo de acción real (77,114,128).

Para el extracto de *A. virgata* el análisis realizado muestra como compuestos principales a la hoffmaniacetona-17-O-acetato y el ácido ferúlico, sin embargo, en los cromatogramas también fueron detectados alguno isómeros de la misma masa molecular que la hoffmaniacetona-17-O-acetato, por lo tanto, la actividad antibiofilm registrada de este extracto puede deberse al efecto de los compuestos identificados o sus isómeros. La presencia de hoffmaniacetona ya fue descrita en la especie de *A. virgata*, como también su actividad antimicrobiana frente a la especie bacteriana *Staphylococcus aureus*, pero aún no existen reportes en cuanto a su actividad antibiofilm (153).

El ácido ferúlico ya fue reportado como uno de los compuestos de la especie *Aloysia polystachya*. Existen estudios respecto a la actividad antibiofilm del ácido ferúlico, donde se describe con excelente actividad sobre el biofilm de especies bacterianas Gram negativa como Gram positiva y que su principal mecanismo de acción se deba a los cambios irreversibles en la membrana celular respecto a la carga como permeabilidad, por lo que se supone que sea unos de los mecanismos de acción antibiofilm implicados para el extracto de *A. virgata* en estudio (154,155).

La huella dactilar cromatográfica es utilizada generalmente de manera preliminar, ya que no puede relacionar con certeza los picos detectados a los metabolitos indicados (156).

El paso siguiente a nivel de análisis instrumental para determinar con certeza dicha composición debe realizarse un análisis espectral del extracto con la metodología de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), siendo esta una perspectiva del trabajo a futuro cuando se pueda contar con este equipo a nivel país. Aún, así los resultados obtenidos en este trabajo son de un gran valor desde el punto de vista de dejar datos de base para el análisis de los posibles compuestos activos y por ende de donde se deberá continuar con los análisis apropiados hasta la caracterización completa de los compuestos activos.

El principal interés de identificar los posibles genes implicados en la formación de biofilm de los patógenos estudiados, radica en la intención de utilizarlos como diana para una terapia antibiofilm, comprender posibles mecanismos o vías de acción, ya sea en la inhibición o modulación de esta, como también para predecir el comportamiento de los aislados bacterianos que los portan, en relación con su potencial formador.

Los resultados reportados en este trabajo presentan datos preliminares acerca de la eficacia de los extractos provenientes de plantas nativas del Paraguay como fuente de compuestos antibiofilm, y que permiten abrir horizontes sumamente amplios de posibilidades para abarcar más investigaciones con el objeto de la identificación, aislamiento y caracterización de los compuestos que están involucrados en los efectos observados, además de realizar estudios a fin de elucidar los mecanismos moleculares implicados de forma a tener un mejor entendimiento de cómo combatir a estos patógenos y encontrar soluciones a la creciente problemática de los mecanismos de resistencia a los biocidas.

6. CONCLUSIÓN

Los tres genes implicados en la formación de biofilm fueron detectados en los aislados estudiados, siendo portados de forma simultánea en 3 de los 4 aislados STEC analizados.

Los extractos de *Sidastrum paniculatum*, *Aloysia virgata* y *Ocotea diospyrifolia*, demostraron excelente actividad inhibitoria y removedora de biofilm sobre los 4 aislados STEC analizados, con respuesta dosis dependiente.

Algunos extractos como el *Centratherum punctatum*, *Aegiphila brachiata*, *Tessaria dodoneifolia*, *Solidago chilensis* y *Genipa americana* presentaron el efecto inductor como fijador de biofilm en STEC, con variaciones del efecto según el aislado analizado.

Fueron identificados como parte del análisis de la huella dactilar cromatográfica los metabolitos moupinamida, ácido coutárico y el ácido caftárico en el extracto de *Sidastrum paniculatum*. Los alcaloides aporfínicos dicentrina, glaucina y norisoboldina en el extracto de *Ocotea diospyrifolia* y los metabolitos ácido ferúlico y hoffmaniacetona en el extracto de *Aloysia virgata*. El rol de estos metabolitos en el efecto sobre el biofilm constituye un punto importante para futuros trabajos de investigación.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sanchez JD, Guía VETA: Inocuidad de alimentos. OPS OMS . Pan American Health Organization / World Health Organization. 2015; 4(1), 23.
2. CDC - Los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos son mortalmente graves. Guía de cómo evitarlos. 2017;3(2),20.
3. Y. Sasaki, M. Murakami, M. Haruna, N. Maruyama, Journal Veterinaric Medical. Prevalence and Characterization of Foodborne Pathogens in Dairy Cattle in the Eastern Part of Japan. 2017;12-0327
4. E.F.S.A. Food-borne zoonotic diseases. Research European Food Safety Authority; 2018;20-23
5. Organización Panamericana de la Salud. Consulta técnica conjunta FAO/OPS/OMS sobre inocuidad y comercialización de alimentos.2018 6-8.9
6. Organización Mundial de la Salud. Impacto de la crisis financiera y económica mundial en la salud. WHO. World Health Organization; 2021. 20-40.1
7. CDC -Dairy Product Safety System. A technical manual for the entire dairy industry encompassing basic sanitation, good manufacturing practices, and focusing on Hazard Analysis and Critical Control Point. Washington, D.C.2011.
8. Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, Caletti MG, Vallés P, Roldán CD, et al. Risk Factors for Sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Infections in Children, Argentina. Emerg Infect Dis.2008;14(5):763-71.
9. Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega EE, de la Torre JH, Linares LH, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:171.

10. Estimates of Foodborne Illness in the United States. Estimates of Foodborne Illness. CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/foodborneburden/index.html>
11. Food and Drug Administration (FDA). The Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Center for Food Safety & Applied Nutrition, 2012.
12. Giugno SM, Bibiloni N, Rahman R, Miliwebsky E, Chinen I, Rivas M. Asociación del síndrome urémico hemolítico con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Acta Bioquímica Clínica Latinoam. 2007;41(1):27-33.
13. Karama M, Johnson RP, Holtslander R, McEwen SA, Gyles CL. Prevalence and characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in cattle from an Ontario abattoir. Can J Vet Res Rev Can Rech Veterinaire.2008;72(4):297-302.
14. Hur J, Jeon BW, Kim YJ, Oh IG, Lee JH. *Escherichia coli* isolates from calf diarrhea in Korea and their virulent genetic characteristics. J Vet Med Sci.2013;75(4):519-22.
15. Carlos, C., Pires, M.M., Stoppe, N.C. et al. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. BMC Microbiol 10, 161 (2010).
16. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. enero de 1998;11(1):142-201.
17. Varela G, Chinen I, Gadea P, Miliwebsky E, Mota MI, González S, et al. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. Rev Argent Microbiol. 2008;40(2):93-100.
18. Noceda C, Alberto L. Hemolytic Uremic Syndrome Caused by Shiga Toxin type 2 Produced by Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: First Case Described in Paraguay. Pediatría Asunción. 2009;36(2):127-32.

19. Síndrome Urémico-Hemolítico por *E. Coli* Entero-Hemorrágica O157:H7 Stx2: Primer Caso Descrito en Paraguay. Memorias del IICS. 2012:12-17.
20. Ingerson-Mahar M, Reid A. FAQ: *E. Coli*: Good, Bad, and Deadly. ASM science. 2011;23-26.
21. Fernández D, Irino K, Sanz ME, Padola NL, Parma AE. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina. Lett Appl Microbiol. 2010;51(4):377-82.
22. Molina PM, Sanz ME, A. Lucchesi PM, Padola NL, Parma AE. Effects of acidic broth and juices on the growth and survival of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Food Microbiol. 2005;22(5):469-73.
23. Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. J Clin Microbiol. 2008;36(2):598-602.
24. Etcheverría AI, Padola NL, Sanz ME, Polifroni R, Krüger A, Passucci J, et al. Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. Meat Sci. 2010;86(2):418-21.
25. Carlson BA, Nightingale KK, Mason GL, Ruby JR, Choat WT, Loneragan GH, et al. *Escherichia coli* O157:H7 strains that persist in feedlot cattle are genetically related and demonstrate an enhanced ability to adhere to intestinal epithelial cells. Appl Environ Microbiol. 2009;75(18):5927-37.
26. Etcheverría AI, Padola NL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Virulence. 2013;4(5):366-72.
27. Hussein HS. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. J Anim Sci. 2007;85(13 Suppl):E63-72.

28. Leotta GA, Miliwebsky ES, Chinen I, Espinosa EM, Azzopardi K, Tennant SM, et al. Characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 strains isolated from humans in Argentina, Australia and New Zealand. *BMC Microbiol.* 2008;8(1):46.
29. Biscola FT, Abe CM, Guth BEC. Determination of adhesin gene sequences in, and biofilm formation by, O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from different sources. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(7):2201-8.
30. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. Carpentier. *Journal of Applied Microbiology - Wiley Online Library.* 2017.
31. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms. *Science.* 2009;284(5418):1318-22.
32. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Disease journal - CDC.* 2002;8,9-12.
33. Else TA, Pantle CR, Amy PS. Boundaries for Biofilm Formation: Humidity and Temperature. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(8):5006-10.
34. Sutherland IW. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology Society Journals.* 2017. 147: 3-9
35. Branda SS, Vik Å, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 2005;13(1):20-6.
36. Davey ME, O'toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.*2000;64(4):847-67.
37. P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology.* 2002 56:1, 187-209
38. Dunne WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):155-66.

39. Cogan NG, Keener JP. The role of the biofilm matrix in structural development. *Math Med Biol J IMA*. 2004;21(2):147-66.
40. J W Costerton, Z Lewandowski, D E Caldwell, D R Korber, Lappin-Scott and HM. Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 2005;49(1):711-45.
41. Wu H, Song Z, Hentzer M, Andersen JB, Molin S, Givskov M, et al. Synthetic furanones inhibit quorum-sensing and enhance bacterial clearance in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53(6):1054-61.
42. Hume EBH, Baveja J, Muir B, Schubert TL, Kumar N, Kjelleberg S, et al. The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and in vivo infection rates by covalently bound furanones. *Biomaterials*. 2004;25(20):5023-30.
43. Sperandio V, Torres AG, Girón JA, Kaper JB. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol*. 2001;183(17):5187-97.
44. Farfan M. J., Inman K. G., Nataro J. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. *Infect. Immun*. 2008;76:4378–4384
45. Pratt LA, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*. 2000;30(2):285-93.
46. Ryu J. H., Beuchat L. R. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and curli production on its resistance to chlorine. *Appl. Environ. Microbiol*. 2015;71:247–254
47. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 1997;61(2):136-69.
48. Otto K, Norbeck J, Larsson T, Karlsson KA, Hermansson M. Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. *J Bacteriol*. 2001;183(8):2445-53.

49. Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun.* 2001;69(3):1231-43.
50. Klemm P, Hjerrild L, Gjermansen M, Schembri MA. Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2004;51(1):283-96.
51. Hasman H, Chakraborty T, Klemm P. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. *J Bacteriol.* 2002;181(16):4834-41.
52. Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol.* 2000;37(2):424-32.
53. Kjaergaard K, Schembri MA, Ramos C, Molin S, Klemm P. Antigen 43 facilitates formation of multispecies biofilms. *Environ Microbiol.* 2000;2(6):695-702.
54. Schembri MA, Klemm P. Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction. *EMBO J.* 2001;20(12):3074-3081
56. Olsén A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature.* 2019;338(6217):652-5.
57. Cookson AL, Cooley WA, Woodward MJ. The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2002;292(3-4):195-205.
58. Bian Z, Normark S. Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 2001;16(19):5827-36.
59. Vidal O, Longin R, Prigent-Combaret C, Dorel C, Hooreman M, Lejeune P. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J Bacteriol.* 2004;180(9):2442-9.

60. Wang X, Preston JF, Romeo T. The pgaABCD locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol.* 2004;186(9):2724-34.
61. Polifroni R, Etcheverría AI, Padola NL, Parma AE. *Escherichia coli* verocitotoxigénico (VTEC): Características de virulencia y persistencia en el medio ambiente. *InVet.* 2009;11(1):65-70.
62. Restieri C, Garriss G, Locas M-C, Dozois CM. Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(5):1553-62.
63. Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis.* 1998;42(1):106-18.
64. Wang J, Stanford K, McAllister TA, Johnson RP, Chen J, Hou H, et al. Biofilm Formation, Virulence Gene Profiles, and Antimicrobial Resistance of Nine Serogroups of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis.* 2016;13(6):316-24.
65. Chmielewski R, Frank J. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2003;2(1):22-32.
66. Téllez S. Los Biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria. *VISAVET Outreach J.* 2010
67. Ryu J-H, Kim H, Beuchat LR. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *J Food Prot.* 2004;67(10):2123-31.
68. Wilks SA, Michels H, Keevil CW. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *Int J Food Microbiol.* 2005;105(3):445-54.

69. Paraguay apunta a conquistar 70 mercados más con la carne [Internet]. La Nación. [citado 20 de abril de 2017]. Disponible en: [/2017/01/22/paraguay-apunta-conquistar-70-mercados-mas-la-carne/](#)
70. Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal (SENACSA) - Portal Paraguay [Internet]. [citado 9 de mayo de 2017]. Disponible en: <https://www.paraguay.gov.py/senacsa>
71. SENACSA: Productos y Subproductos de Origen Animal [Internet]. [citado 2017]. Disponible en: <http://www.senacsa.gov.py/index.php/informaciones/productos-y-subproductos-de-origen-animal>
72. Rusia cierra temporalmente sus puertas a 6 frigoríficos paraguayos [Internet]. [citado 20 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.ultimahora.com/rusia-cierra-temporalmente-sus-puertas-6-frigorificos-paraguayos-n749065.html>
73. Color ABC. Frigorífico con antecedentes pone en peligro estatus sanitario del país - Artículos - ABC Color [Internet]. [citado 20 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.abc.com.py/articulos/frigorifico-con-antecedentes-pone-en-peligro-estatus-sanitario-del-pais-290675.html>
75. Rivelli Zea SM, Padola NL, Etcheverría AI, Florentín M, Acuña P, Rodríguez F, et al. Caracterización molecular de aislamientos de *Escherichia coli* productores de toxina Shiga obtenidos en 2 establecimientos ganaderos del Paraguay. Rev Argent Microbiol. 2020;52(2):131-5.
76. Rojas N, Guillén R. Caracterización del perfil de virulencia de aislados de *Escherichia coli* productoras de la toxina Shiga (STEC) de materia fecal de ganado bovino y carne molida en el año 2016. [Paraguay]: Universidad Nacional de Asunción; 2017.
77. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):564-82.

78. Elisha IL, Botha FS, Mcgaw LJ, Eloff JN. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. BMC Complement Altern Med. 2017;17(133):1-10.
79. Kuete V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A review. Planta Med. 2010;76:1479-91.
80. Mbaveng AT, Sandjo LP, Tankeo SB, Ndifor AR, Pantaleon A, Nagdju BT, et al. Antibacterial activity of nineteen selected natural products against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes. SpringerPlus. 2015;4.
81. Mostafa AA, Al-askar AA, Almaary KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi J Biol Sci. 2018;25:361-6.
82. Piegerová A, Koščová J, Schusterová P, Nemcová R, Kryvtsova M. In Vitro Inhibition of Biofilm *E.coli* Formation by Under the Action of Selected Plant Extracts. Folia Vet. 2019;63(1):48-53.
83. Romero CM, Vivacqua CG, Abdulhamid MB, Baigori MD, Slanis AC, de Allori MCG, et al. Biofilm inhibition activity of traditional medicinal plants from Northwestern Argentina against native pathogen and environmental microorganisms. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49(6):703-12.
84. Michajluk J, Bazán D, Mereles L, Degen R, Alvarenga N. Caracterización física, análisis fitoquímico, huella digital cromatográfica, capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de los frutos de *Vitex megapotamica*. Rev Cuba Plantas Med. 2019;24(1).
85. Bobadilla D, Flores-Giubi ME, Alvarenga N. Synergistic effect of (S)-Cis-Verbenol with antibiotics Amoxicillin and Gentamicin Against sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* strains. Int J Pharm Sci Res. 2019;10(5):2182-8.

86. Hiebert MR, Flores-Giubi ME, Barua JE, Molinas-Salinas GM, Ferro EA, Alvarenga NL. Antimycobacterial Activity of the Ethanolic Extract of the Wood of *Bulnesia Sarmientoi* Lorentz Ex. Griseb. *Rev Latinoam Quím.* 2012;40(1).
87. Stopiglia CDO, da Rocha Vianna D, de Carvalho Meirelles G, Teixeira H, von Poser GL, Scroferneker ML. Antifungal activity of *Pterocaulon* species (*Asteraceae*) against *Sporothrix schenckii*. *J Mycol Médicale.* 2011;21(3):169-72.
88. Weber LD, Scur MC, Souza JG, Toledo AG, Pinto F. Antimicrobial activity and phytochemical prospection of vegetal extracts of *Ocotea silvestris* Vattimo-Gil and *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) against serotypes of *Salmonella* of poultry origin. *Rev Bras Saúde E Prod Anim.* 2018;19(1):116-24.
89. Habtemariam S, Macpherson AM. Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Ethanol Extract from Leaves of a Herbal Drug, Boneset. *Eupatorium perfoliatum.* 2000;577:575-7.
90. Turatti ICC, Furtado. Communications S. Antimicrobial Activity of the Leaf Extracts of *Hyptis suaveolens* (L .) 2007; 23-27.
91. Ferreira MA, Carvalho TC, NAJ. Antimicrobial activity of *Aegiphila sellowiana* Cham ., *Lamiaceae* , against oral pathogens. *Revissta Bras Farmacogn.* 2010;20(2):246-9.
92. Sánchez EM, Azahuanche FP, Alva AS. Actividad antileishmaniásica in vitro del extracto metanólico de las flores de *Tessaria integrifolia* R. et P. (*Asteraceae*). *Pueblo Cont.* 2016;18(1):101-8.
93. Oliva MM, Demo MS, Lopez AG, Lopez ML, Julio A, Oliva MM, et al. Antimicrobial Activity and Composition of *Hyptis mutabilis* Essential Oil Antimicrobial Activity and Composition of *Hyptis mutabilis* Essential Oil. *J Herbs Spices Amp Med Plants.* 2008;11(4):57-63.

94. Vennila V, Udayakumar R. Antibacterial Activity of *Croton bonplandianum* (Bail.) Against Some Bacterial Isolates from Infected Wounds. *Br Microbiol Res J*. 2014;5(1):83-93.
95. Medeiros-Neves B, Teixeira HF, Poser GL Von. The genus *Pterocaulon* (*Asteraceae*)—A review on traditional medicinal uses, chemical constituents and biological properties. *J Ethnopharmacol*. 2018;224:451-64.
96. Banso A. Comparative studies of antimicrobial properties of *Cardiospermum gradiflorum* and *Cardiospermum halicacabum*. *Niger J Health Biomed Sci*. 2007;6(1):31-4.
97. Vivot E, Massa R, Cruañes MJ, Muñoz JDD, Ferraro G, Gutkind G, et al. Actividad Antimicrobiana In Vitro de Seis Especies Autóctonas de la Flora de Entre Ríos (Argentina). *Lat Am J Pharm*. 2007;26(4):563-6.
98. Ojeda AM. Antimicrobial Activities of *Genipa americana*. *Bios*. 1966;37(3):108-11.
99. Santos TG, Laemmle J, Rebelo RA, Dalmarco EM, Cruz B, Schmit AP, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Aloysia gratissima* (*Verbenaceae*) leaf essential oil. *J Essent Oil Res*. 2015;27(2):125-30.
100. Chitra B, Brindha P, Vijayakumar ABS. Protease activity of floral extracts of *Centratherum punctatum* Cass. A wound healing herb. *World J Pharm Res*. 2016;5(6):1079-83.
101. Liz R, Neiva T, Moritz JC, Dalmarco E, S. Frode T. Evaluation of antimicrobial and antiplatelet aggregation effects of *Solidago chilensis* Meyen. *Int J Green Pharm*. 2009;35-9.
102. Teles YCF, Chaves OS, Agra M de F, Batista LM, Queiroz AC de, Araújo MV de, et al. Chemical constituents from *Sidastrum paniculatum* and evaluation of their leishmanicidal activity. *Rev Bras Farmacogn*. 2015;25(4):363-8.

103. Johnson JR, Stell AL. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J Infect Dis.* 2000;181(1):261-72.
104. Florentín M, Acuña P, Rojas N, Rodríguez F, Guillén R. Portación de *fimH* en aislados de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga provenientes de ganado bovino, Departamento Cordillera, Paraguay. *Mem Inst Investig En Cienc Salud.* 2018 16(1).
105. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods.* 2007;42(4):321-4.
106. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter - plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000;40:175-9.
107. Famuyide IM, Aro AO, Fasina FO, Eloff JN, McGaw LJ. Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine under- investigated south African *Eugenia* and *Syzygium (Myrtaceae)* species and their selectivity indices. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19(141):1-13.
108. Yuyama KT, Wendt L, Surup F, Kretz R, Chepkirui C, Wittstein K, et al. Cytochalasins Act as Inhibitors of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus*. *Biomolecules.* 2018;8(4):1-14.
109. Bhomkar P, Materi W, Semenchenko V, Wishart DS. Transcriptional Response Of *E. coli* Upon *FimH*-mediated Fimbrial Adhesion. *Gene Regul Syst Biol.* 2010;4:1-17.
110. Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol.* 2005;156(5-6):626-33.
111. Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol.* 2005;156(5-6):626-33.

112. Wang J, Stanford K, McAllister TA, Johnson RP, Chen J, Hou H, et al. Biofilm Formation, Virulence Gene Profiles, and Antimicrobial Resistance of Nine Serogroups of Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis.* 2016;13(6):316-24.
113. Ali NH, Faizi S, Kazmi SU. Antibacterial activity in spices and local medicinal plants against clinical isolates of Karachi, Pakistan. *Pharm Biol.* 2011;49(8):833-9.
114. Lee J-H, Regmi SC, Kim J-A, Cho MH, Yun H, Lee C-S, et al. Apple Flavonoid Phloretin Inhibits *Escherichia coli* O157:H7 Biofilm Formation and Ameliorates Colon Inflammation in Rats. *Infect Immun.* 2011;79(12):4819-27.
115. Guzzo F, Scognamiglio M, Fiorentino A, Buommino E, D'Abrosca B. Plant Derived Natural Products against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: Antibiofilm Activity and Molecular Mechanisms. *Mol Basel Switz.* 2020;25(21).
116. Li J, Xie S, Ahmed S, Wang F, Gu Y. Antimicrobial Activity and Resistance : Influencing Factors. *Front Pharmacol.* 2017;8(364):1-11.
117. Cheung AL, Fischetti VA. Variation in the Expression of Cell Wall Proteins of *Staphylococcus aureus* Grown on Solid and Liquid Media. *Infect Immun.* 1988;56(5):1061-5.
118. Monecke S, Ehricht R, Slickers P, Wiese N, Jonas D. Intra-strain variability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains ST228-MRSA-I and ST5-MRSA-II. *Eur J Clin Microbiol Infectious Dis.* 2009;28:1383-90.
119. Carolina A, Silva O, Santana EF, Saraiva AM, Coutinho FN, Henrique R, et al. Which Approach Is More Effective in the Selection of Plants with Antimicrobial Activity. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:1-9.
120. Mozhiyarasi P, Anuradha R. A study on phytochemical analysis and antimicrobial activity of. 2016;5.

121. Olaoluwa OO, Olapeju AO. Phytochemical Investigation and Antimicrobial Screening of *Cardiospermum grandiflorum* (Sweet) [Sapindaceae]. 2015;6:4.
122. Arruda G, Gabriela L, Périco V, Parpinelli R, Peretti RF, Scur MC, et al. Phytochemical Prospecting , Antimicrobial Activity , and Acute Toxicity of Aqueous Plant Extract of Two Plant Species *Allophylus edulis* (A. St. Hilaire, Cambessedes & A. Jussieu) RADLK ex WARM and *Matayba elaeagnoides* RADLK. Int J New Technology Res. 2018;5(2):10-3.
123. Meléndez PA, Capriles VA. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. Phytomedicine. 2006;13:272-6.
124. Diaz M, Sousa L, Morais F. Aspectos etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos de especies de *Rubiaceae* en Brasil. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2013; 18(1):140-156
125. Montanari RM, Barbosa LCA, Demuner AJ. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Verbenaceae*. Quím Nova. 2011;34(9):1550-5.
126. Basualdo I, Soria N, Ortíz M, Degen R. Plantas medicinales comercializadas en los mercados de Asunción y Gran Asunción. Parte I. Rojasiana. 1992;3(2):197-238.
127. Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. Nat Chem Biol.2007;3(7):408-14.
128. Mastro-Durán R, Borja-Padilla R. Actividad antioxidante de esteroides y ácidos orgánicos naturales. Grasas Aceites. 2003;44(3):208-12.
129. Hall CW, Mah T-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(3):276-301.
130. Vandresen F, Schmitt E, Kato L, Oliveira C, Bersani-Amado C, Silva C. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e anti-dematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., *Verbenaceae*. Rev Bras Farmacogn.2010;20:317-21.

131. Namasivayam SKR, Allen Roy E. Anti biofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. Int J Pharm Sci. 2014;5(2):486-9.
132. Upadhyay A. Investigating the Potential of Plant-derived Antimicrobials and Probiotic Bacteria for Controlling *Listeria monocytogenes*. OpenCommons; 2014;1: 2-12
133. Taganna JC, Quanico JP, Marie R, Perono G, Amor EC, Rivera WL. Tannin-rich fraction from *Terminalia catappa* inhibits quorum sensing (QS) in *Chromobacterium violaceum* and the QS-controlled biofilm maturation and LasA staphylolytic activity in *Pseudomonas aeruginosa*. J Ethnopharmacol. 2011;134:865-71.
134. Zhang J, Rui X, Wang L, Guan Y, Sun X, Dong M. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation. Food Control. 2014;42:125-31.
135. Kumari P, Arora N, Chatrath A, Gangwar R, Pruthi V, Poluri KM, et al. Delineating the Biofilm Inhibition Mechanisms of Phenolic and Aldehydic Terpenes against *Cryptococcus neoformans*. ACS Omega.2019;4(18):17634-48.
136. Alarcón R, Carrizo Flores R, Ocampos S, Lucatti A, Flores Galleguillo L, Tonn C, et al. Flavonoids from *Pterocaulon alopecuroides* with Antibacterial Activity. Planta Med. 2008;74:1463-7.
137. Vilegas W, Borallo N, Cabrera A, Bernardi AC, Pozetti GL, Arantes SF, et al. Coumarins and a Flavonoid from *Pterocaulon alopecuroides*. Phytochemistry. 1995;38(4):1017-9.
138. Winkler AC, Gomes O, Dallarmi M. Revisão do gênero *Pterocaulon*-Aspectos fitoquímicos e Atividades Biológicas. Visao Acad. 2004;5(1):53-60.
139. Lee J-H, Kim Y, Seob H, Yong S, Hwan M, Lee J. Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. Phytomedicine. 2014;2-21

140. Reen FJ, Gutiérrez-Barranquero JA, Parages ML, O’Gara F. Coumarin : a novel player in microbial quorum sensing and biofilm formation inhibition. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102:2063-73.
141. Barraud N, Storey M. Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microbial Biotechnology.* 2009;2(3),370-378
142. Petrova OE, Sauer K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Curr Opin Microbiol.*2016;30:67-78.
143. Perera M, Wijayarathna D, Wijesundera S, Chinthaka M, Seneviratne G, Jayasena S. Biofilm mediated synergistic degradation of hexadecane by a naturally formed community comprising *Aspergillus flavus* complex and *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):84.
144. Qurechi N, Gunther N. *Biofilms in the Food and Beverage Industries.* Woodhead Publishing. Food Science, Technology and Nutrition.;2009;474-98.
145. Bailac P, Dellacasa AD, Duschatzky CB, Firpo N, Ponzi M. Composicion del aceite esencial y actividad antimicrobiana de *Aloysia gratissima* de San Luis - Argentina. *An Asoc Quimica Argent.*1999;87:149-53.
146. L. Martorelli, A. Albanese, D. Vilte, R. Cantet, A. Bentancor, G. Zolezzi, I. Chinen, C. Ibarra, M. Rivas, E.C. Mercado, A. Cataldi et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O22:H8 isolated from cattle reduces *E. coli* O157:H7 adherence in vitro and in vivo. *Vet Microbiol.*2017;208:8-17.
147. Saito N, Kawano M, Kobayashi T, Watanabe S, Yamada W, Yatsu J, et al. An outbreak of food poisoning caused by an enteropathogenic *Escherichia coli* O115:H19 in Miyagi Prefecture. *Jpn J Infect Dis.* 2005;58:189-90.

148. Rumi MV, Irino K, Deza N, Huguet MJ, Bentancor AB. First isolation in Argentina of a highly virulent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O145:NM from a domestic cat. *J Infect Dev Ctries.*2012;6(4):358-63.
149. Barbosa H, Costa-Silva TA, Conserva GAA, Araujo AJ, Lordello ALL, Antar GM, et al. Aporphine Alkaloids from *Ocotea puberula* with Anti-Trypanosoma Cruzi Potential – Activity of Dicentrine- β -N-Oxide in the Plasma Membrane Electric Potentials. *Chem Biodivers.* 2021;(1)32-45
150. García J, Alvarenga N. Actividad sinérgica in vitro de los alcaloides Crotosparina y Esparsiflorina aislados de *Croton bomplandianum* frente a *Pseudomonas aeruginosa*. *Mem Inst Investig En Cienc Salud.* 2019;17(1):47-53.
151. Ibarra E, Pacheco M, García M. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. *Rev. fitotec. mex [revista en la Internet].* 2011; 34(4): 241-246
152. Gomes RA, Teles YCF, Pereira F de O, Rodrigues LA de S, Lima E de O, Agra M de F, et al. Phytoconstituents from *Sidastrum micranthum* (A. St.-Hil.) Fryxell (*Malvaceae*) and antimicrobial activity of pheophytin a. *Braz J Pharm Sci.*2015;51(4):861-7.
153. Vandresen F, Schmitt E, Kato L, Oliveira C, Amado C, Silva C. Constituintes químicos e avaliação das atividades antibacteriana e antiedematogênica de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook.) Tronc. e *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., *Verbenaceae*. *Rev. bras. farmacogn.* 2010; 20(3): 317-321.
154. Marchetti L, Pellati F, Graziosi R, Brighenti V, Pinetti D, Bertelli D. Identificación y determinación de glucósidos fenilpropanoides bioactivos de *Aloysia polystachya* (Griseb. et Moldenke) por HPLC-MS. *J. Pharm Biomed Anal.* 2019;166:364-370
155. Borges A, Saavedra MJ, Simões M. La actividad de los ácidos ferulicos y galos en la prevención y control de bacterias patógenas. *Biofouling.* 2012;28(7):755-67

156. Guan X-Y, Li H-F, Yang W-Z, Lin C-H, Sun C, Wang B-R, et al. HPLC-DAD-MSn analysis and HPLC quantitation of chemical constituents in Xian-ling-gu-bao capsules. *J Pharm Biomed Anal.*2011;55(5):923-33.

8. ANEXOS

Anexo 1. Informe de aceptación del protocolo de Investigación del proyecto marco denominado "Formación de biofilm en aislados STEC provenientes de ganado bovino del Departamento de Cordillera del Paraguay en el año 2016" por los Comités Científico y de Ética del IICS.



Universidad Nacional de Asunción
RECTORADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
COMITÉ de ÉTICA en INVESTIGACION (CEI)

INFORME DE ACEPTACION DE MATERIAL

A : MELISA FLORENTIN
C.C. : SALINAS C., ESCOBAR F., ACUÑA P., RODRIGUEZ F,
GUILLEN R.
Código : C04/2018
Fecha : 18/04/2018

Por la presente informamos que *el resumen para presentación a Congreso* remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:


"Formación de biofilm en aislados STEC provenientes de muestras de materia fecal de ganado bovino del departamento de Cordillera del Paraguay en el año 2016".

Ha sido aceptado




COMITÉ CIENTÍFICO (CC)
Dra. Vivian Giménez B.
Coordinadora




COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACION (CEI)
Dra. Eva Nara
Coordinadora

Anexo 2. Informe de aceptación del protocolo de Investigación denominado “Evaluación de la actividad de extractos de plantas como inhibidores de biofilm en aislados STEC” por los Comités Científico y de Ética del IICS.



Universidad Nacional de Asunción
RECTORADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD
COMITÉ CIENTIFICO (CC)
COMITÉ de ETICA en INVESTIGACION (CEI)

**INFORME DE ACEPTACION DE PROTOCOLO
ADENDA**

A : MELISA FLORENTIN
C.C. : ROSA GUILLÉN, NELSON ALVARENGA
Código : P24/2019 ADENDA DEL P12/2018
Fecha : 01/11/2019

Por la presente informamos que el protocolo de investigación remitido a estos Comités para su revisión bajo el título de:

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS COMO INHIBIDORES DE BIOFILM EN AISLADOS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORES DE TOXINA SHIGA (STEC)”.



COMITÉ CIENTIFICO (CC)
Dra. Vivian Giménez
Coordinadora

Ha sido aceptado



COMITÉ DE ETICA EN INVESTIGACION (CEI)
Dra. Eva Nara
Coordinadora